

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

EAP. DE MEDICINA VETERINARIA

**Identificación de bacterias de la familia pasteurellaceae
causantes de procesos neumónicos en crías de alpacas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Cynthia Isabel LEÓN LLERENA

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2012

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
LISTA DE CUADROS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. Antecedentes	3
2. Factores Predisponentes	4
2.1. Factores intrínsecos	5
2.1.1. La edad	5
2.1.2. La raza	5
2.2. Factores extrínsecos	5
2.2.1. Manejo	5
a) El destete	5
b) Malnutrición de las madres	5
c) Condiciones de los dormitorios	5
d) Suministro de biberón	5
e) Caminatas	5
f) Suministro de calostro	6
g) Época del año	6
h) Condiciones medioambientales	6
3. Agentes involucrados	7
3.1. Familia Pasteurellaceae	8
3.1.1. Género <i>Pasteurella</i>	8
3.2. Complejo <i>Pasteurella haemolytica</i>	9
3.2.1. <i>Mannheimia haemolytica</i>	10
3.2.2. <i>Mannheimia glucosida</i>	11
3.3. Características del género <i>Mannheimia</i>	13
3.4. <i>Biberstenia trehalosi</i>	13
3.4.1. Características del género <i>Biberstenia</i>	14
4. Epidemiología	14

5.	Patogenia	15
5.1.	Transmisión	15
5.2.	Patogenicidad	15
5.3.	Patogénesis	15
6.	Signos clínicos	16
7.	Diagnóstico	17
7.1.	Historia clínica	17
7.2.	Diagnóstico Bacteriológico	17
7.3.	Serotipificación	19
8.	Hallazgos de necropsia	20
9.	Tratamiento	22
10.	Prevención	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
1.	Lugar y duración del estudio	26
2.	Tamaño de muestra	26
3.	Animales	26
4.	Muestras	27
5.	Recolección de datos	27
6.	Procesamiento de las muestras	27
6.1.	Materiales	27
6.1.1.	Materiales para el muestreo	27
6.2.2.	Equipo y Material de laboratorio	27
6.2.	Procesamiento	28
7.	Análisis estadístico	29
IV.	RESULTADOS	31
1.	Población afectada	31
2.	Signos respiratorios	31
3.	Hallazgos de necropsia	32
4.	Clasificación macroscópica de las neumonías	33
5.	Aislamiento de colonias	34
a.	Pruebas bioquímicas	35
6.	Especies aisladas	36
V.	DISCUSIÓN	38
VI.	CONCLUSIONES	41

VII.	RECOMENDACIONES	42
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en la estación experimental del IVITA de Marangani con el objetivo de caracterizar fenotípicamente las especies bacterianas pertenecientes a la familia Pasteurellaceae, responsables de procesos neumónicos en crías de alpaca debido a que, en el país ésta es una de las principales causas de mortalidad, luego de las enterotoxemias, lo cual ocasiona grandes pérdidas económicas. Para el presente estudio se usaron muestras de pulmones de crías de alpaca que murieron durante la etapa neonatal entre 0 y 30 días en un período de tiempo de Enero de 2009 hasta Marzo del mismo año, las cuales luego fueron llevadas al laboratorio a fin de obtener muestras de pulmón con lesiones compatibles con neumonía los cuales por análisis bacteriológicos nos permitieron identificar las especies causantes de neumonía. Encontrando que las crías de la 3° y 4° semana eran las más afectadas por neumonía y entre las bacterias de la familia Pasteurellaceae encontradas el 37% de los casos fue por *P. multocida*, seguido por *Mannheimia haemolytica* en 17% de los casos, también se demostró la coexistencia de dos o más especies bacterianas de la familia Pasteurellaceae, resaltando la asociación entre *P. multocida* y *M. haemolytica* en el 10% de los casos. El presente estudio nos permite concluir que la afección por procesos neumónicos se presenta en crías de alpaca entre la 3° y 4° semana de edad, siendo los agentes principales de la familia Pasteurellaceae *P. multocida* y *M. haemolytica*, quienes se encuentran con mayor frecuencia, se ha logrado aislar también *Mannheimia spp.* lo cual sugeriría seguir profundizando el estudio con pruebas genéticas a fin de determinar todas las especies de la familia Pasteurellaceae causantes de neumonía en las crías de alpaca en etapa neonatal.

Palabras claves: Neumonía en alpacas, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, familia Pasteurellaceae.

SUMMARY

The following research was made at IVITA experimental station in Maraganí with the objective of characterize phenotypically the bacterial species that belong to Pasteurellaceae family, responsible of pneumonia in baby alpaca, which is the main cause of mortality after enterotoxemias, causing big economic losses. This study was made with lung samples of baby alpaca died at neonatal stage, between 0 to 30 days, at the period between 2009 January-March. The samples were taken to the lab with the purpose of get lung samples that had lesions consistent with pneumonia; the lung samples were subjected to bacteriological analysis to identify the bacterial species responsible of pneumonia. We found that baby alpaca between the 3rd and 4th week were the most affected with pneumonia and between the bacterial species from Pasteurellaceae family the 37% of pneumonia was caused by *P. multocida*, following by the 17% of pneumonia cases caused by *M. haemolytica*, also coexistence of two or more bacterial species was found when 10% of pneumonia cases was caused by *P. multocida* and *M. haemolytica*. This research allow us to affirm that pneumonia cases in baby alpaca have presentation in babies between the 3rd and 4th week, being the main agents of Pasteurellaceae family *P. multocida* and *M. hamolytica*, also *Mannheimia sp.* was isolate, which suggest to continue with more research with genetics test in order to determinate all the Pasteurellaceae bacterial species that cause pneumonia in baby alpacas.

Key words: Alpaca Pneumonia, Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica, Pasteurellaceae family

LISTA DE CUADROS

• Cuadro 1. Datos poblacionales y productivos para alpacas y llamas	3
• Cuadro 2. Angen <i>et al.</i> 1997. Separación fenotípica de especies y taxas del género Mannheimia, correspondiente al complejo [<i>Pasteurella</i>] <i>haemolytica</i> trehalosa negativo	12
• Cuadro 3. Frecuencia relativa (%) de bacterias aisladas de procesos neumónicos en crías de alpaca	14
• Cuadro 4. Características diferenciales para aislamiento bacteriano de agentes causantes de procesos neumónicos en crías de alpacas	18
• Cuadro 5. Caracterización Bioquímica de las especies bacterianas de la familia Pasteurellaceae	29
• Cuadro 6. Detalle de la frecuencia de edades en la cual la cría de alpaca murió o estuvo gravemente enferma por una infección compatible con neumonía	31
• Cuadro 7. Resumen de los signos encontrados en las crías de alpaca en la etapa neonatal.	32
• Cuadro 8. Hallazgos de necropsia. Número de animales con lesiones encontradas en los pulmones examinados relacionados con el rango de edad.	33
• Cuadro 9. Clasificación macroscópica de las neumonías en las crías de alpaca con signos compatibles con neumonía por bacterias de la familia Pasteurellaceae.	34
• Cuadro 10. Determinación del tipo de colonias pertenecientes a la familia Pasteurallaceae pertenecientes a crías de alpacas clasificadas en función a las características de crecimiento.	34
• Cuadro 11. Resultados de la identificación mediante pruebas bioquímicas de los aislados oxidasa positivos.	35
• Cuadro 12. Resumen de las características bioquímicas de los aislados identificados como parte de la familia Pasteurellaceae.	35
• Cuadro 13. Resultado de especies aisladas de los 30 pulmones de crías de alpaca por signos de neumonía.	36
• Cuadro 14. Resultado de las especies aisladas en las 30 crías compatibles con neumonía.	36

- Cuadro 15. Relación del tipo de neumonía causada con las especies bacterianas de mayor presentación

37

I. INTRODUCCIÓN

Los procesos neumónicos suelen constituir una de las principales causas de muerte en crías de alpaca (Ameghino *et al.*, 1991). Con frecuencia la enfermedad puede generalizarse debido a deficiencias en el sistema inmune de la cría, desarrollando procesos septicémicos (Ramírez *et al.*, 1998). Las neumonías agudas son afecciones respiratorias de curso rápido que se han observado en crías de alpaca y animales jóvenes, las muertes de crías por esta causa alcanzan entre 2-27% del total según Ramírez en 1980, igual sucede en llamas.

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) y la alpaca en particular son especies de gran importancia para el Perú (IVITA, 1972). Su población mundial se presenta principalmente en el Perú, siguiéndole Bolivia y Chile respectivamente (INIA, 2008; Bustinza, 2001). La producción anual de fibra de alpaca (*Vicugna pacos*) es una de las principales fuentes de ingreso económico en los andes del Perú (Vallejo, 2011) ya que el 91% de la producción mundial de fibra es de alpaca (Villarroel, 1991; IPAC 2010). Esta actividad viene siendo realizada de manera tradicional por las comunidades andinas “alpaqueras” (Quispe *et al.*, 2009); se estima que compromete directamente a unas 170,000 familias radicadas a lo largo de la cordillera de los Andes, la mayoría de las cuales (95%) tienen hatos de alpacas entre 50 y 100 animales en promedio. (Hoffman, 2002; FAO, 2005; IPAC, 2010).

Las neumonías por tanto afectan la producción y calidad de la fibra de alpacas, que junto a diversos factores como los factores ambientales, los genéticos y los fisiológicos (San Martín, 1996) hacen a la cría más predispuesta a la enfermedad. La mayoría de los pequeños criadores alpaqueros tienen una explotación pecuaria de tipo extensiva. Estos sistemas extensivos de crianza se basan en la explotación de campos nativos de pastoreo (por encima de los 3800 m.s.n.m.) y rebaños mixtos que generalmente incluyen llamas y ovinos (Quispe *et al.*, 2009).

Las alpacas son susceptibles a un gran número de enfermedades (Moro Sommo, 1971). Las enfermedades infecciosas, principalmente los procesos entéricos y neumónicos, constituyen las dos primeras causas de mortalidad neonatal (Ramírez, 1991; Melo, 1997; Victorio *et al.*, 2003). Con frecuencia los procesos neumónicos pueden generalizarse debido a deficiencias en el sistema inmune de la cría, desarrollando procesos septicémicos (Ramírez *et al.*, 1998), Garmendia *et al.* (1987) encontró asociación entre la presentación de procesos neumónicos y niveles bajos (9-15 mg/ml) de IgG en crías menores de 21 días que es la etapa en la que permanece esta protección.

Se han aislado *P. multocida* y *M. haemolytica* de tejido pulmonar de ovinos (Rosadio, 1990) y alpacas (Calsin, 2008; Rosadio *et al.*, 2011) en procesos neumónicos. En el caso de los virus se ha visto una clara predominancia de las interacciones de Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV) y/o Virus de la Parainfluenza Tipo 3 (PI3) asociado con *Pasteurella multocida* o *Mannheimia haemolytica* (Calsín, 2008; Rosadio *et al.*, 2011).

Los miembros de la familia Pasteurellaceae han sufrido diversas reclasificaciones desde 1999, empezando con la introducción del nuevo género *Mannheimia*, donde se incluye y reclasifica a la antes denominada *Pasteurella haemolytica* además de otras cuatro especies establecidas. El género *Pasteurella* también ha sido reclasificado constantemente incluyéndose y excluyéndose algunas especies bacterianas. *P. multocida* es la especie de mayor importancia involucrada en la enfermedad respiratoria de los animales (Watts *et al.*, 1994; Kehrenberg *et al.*, 2001). El presente estudio tuvo como objetivo aislar las especies involucradas en los procesos neumónicos de crías de alpaca pertenecientes a la familia Pasteurellaceae, basándose en pruebas bioquímicas para su identificación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Antecedentes

Las Alpacas en el territorio peruano, producen 91% de la producción mundial de fibra de esta especie (Villarroel, 1991; Instituto Peruano de la Alpaca y Camélidos, IPAC 2010). Su población mundial se presenta principalmente en el Perú, siguiéndole Bolivia y Chile respectivamente (INIA, 2008; Bustinza, 2001).

Cuadro 1. Datos poblacionales y productivos para alpacas y llamas

Parámetros	Especie	Perú	Bolivia	Argentina	Chile
Población	Alpaca	3.041.598(1)	269.285(1)	Pocos(1)	28.551(1)
	Llama	1.462.730(1)	2.237.170(1)	161.402(1)	50.132(1)
Productores de fibras	Alpaca	789.775(2)	13.603(2)	s/d	916(2)
	Llama	297.414(2)	37.000-50.000(2)	2.803(2)	1.388(2)
Producción de fibra	Alpaca	3.399(3)	365(3)	s/d	s/d
	Llama	760(3)	433(3)	70(3)	s/d

(1) Número de individuos, (2) Números de productores, (3) Toneladas por año. Fuente (Quispe *et al.*, 2009)

Las neumonías son procesos inflamatorios pulmonares generalmente de curso rápido (Bustinza, 2001; Ramírez, 1980; Ramírez *et al.*, 1988), consisten en el proceso inflamatorio pulmonar y generalmente con compromiso de los bronquios, alveolos y pleura (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001). Normalmente ocurre después de ciertos periodos de estrés fisiológicos en animales de poca vitalidad y por efecto de los cambios bruscos de las condiciones del medio ambiente (Bustinza, 1980).

En algunas oportunidades cursan con problemas septicémicos (Ramírez, 1980) y la muerte de animales (Bustinza, 2001). Se observa en neonatos y animales jóvenes (Huanca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998), especialmente en crías jóvenes (Bustinza, 2001), hasta el destete principalmente

(Huanca, 1991); pudiendo alcanzar su tasa de mortalidad, entre 2-27% del total (Bustinza, 2001; Ramírez *et al.*, 1998).

Los procesos neumónicos suelen constituir una de las principales causas de muerte en crías de alpaca (Ameghino *et al.*, 1991). Con frecuencia la enfermedad puede generalizarse debido a deficiencias en el sistema inmune de la cría, desarrollando procesos septicémicos (Ramírez *et al.*, 1998). Estos cuadros septicémicos deben ser diferenciados en cuanto a su causa determinante; dentro de ellas debe considerarse los cuadros de onfaloflebitis, cuya presentación se asocia a deficiente desinfección umbilical e higiene (Fernández Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998), y las colisepticemias (Bustinza, 2000).

Las neumonías afectan principalmente a las crías de alpaca, generalmente después de ciertos períodos de estrés fisiológicos o en animales de poca vitalidad y por efecto de cambios bruscos de las condiciones del medio ambiente (Bustinza, 2001), constituyéndose una de las principales causas de muerte en crías de alpacas adultas (Rodríguez y Mimbela, 1980; Barsallo, 1985). En los tuis las presentaciones frecuentes son después de los baños de inmersión y esquila (Bustinza, 2001). Un estudio más demostró que las neumonías agudas suelen constituir una de las principales causas de los altos índices de mortalidad en crías de alpaca. Estas son causadas por diferentes agentes bacterianos y virales que interactúan entre sí generando infecciones mixtas (PI3 y BRSV coexistentes con *P. multocida* y *M. haemolytica*), favoreciendo la proliferación bacteriana (Calsín, 2008).

La mortalidad mensual en crías en 7 años muestra una tendencia cíclica e irregular, cuyos valores más elevados correspondieron a los meses de Enero (9.5%), Febrero (17.5%), Marzo (2.2%). Este hecho nos muestra que las crías entre el nacimiento y los dos primeros meses de vida exigen mayor cuidado y un adecuado programa de prevención y control de sus enfermedades infecciosas, que constituyen los principales problemas sanitarios, seguidos por afecciones orgánicas (Ramírez y Ellis, 1988).

2. Factores Predisponentes

En la presentación de los procesos neumónicos concurren factores predisponentes, los cuales son múltiples y a veces difíciles de identificar (Bustinza, 2000). Como el medio ambiente, el estado del animal y un diversos agentes infecciosos (IVITA, 1998), los cuales se detallan a continuación.

2.1 Factores intrínsecos

2.1.1 La edad

Se ha observado que la edad de las alpacas juega un papel muy importante en la sobrevivencia, así las crías son más susceptibles que los *tuis* y estas más que las adultas (Pizarro, 1999; Bustinza, 2000). La mortalidad en los primeros 30 días es mayor cuanto más jóvenes el animal. Generalmente la mortalidad neonatal son de causas infecciosa, pero puede variar de acuerdo al lugar, lo mismo que el índice de mortalidad (Ameghino, 1991).

2.1.2 La Raza

Los animales de Raza Suri son más susceptibles que los de Raza Huacaya (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2000; Bustinza, 2001), esto se debe a que las alpacas de Raza Suri son portadoras de genes semiletales (Bustinza, 2000).

2.2 Factores extrínsecos

2.2.1 Manejo

- a) **El destete.** La época de destete provoca estrés en los animales jóvenes (Pizarro, 1999), por el cambio de ambiente y alimentación, ya que éstos dejan de mamar (Bustinza, 2000; Bustinza, 2001).
- b) **Malnutrición de las madres.** El hábitat natural de la alpaca son los ecosistemas andinos localizados entre los 3 800 y 5 000 metros sobre el nivel del mar, cuyos pastos son muy pobre en nutrientes debido a las condiciones del suelo y la erosión (Huanca *et al.*, 2011). Esto sumado a la mala selección de campos o en su defecto la selección de campos pobres, lo cual ocasiona una falta de producción de leche por lo que paren crías débiles (Pizarro, 1999; Bustinza, 2000). Como se presenta en los sistemas de crianza extensiva en los cuales además se practica la crianza mixta incluyendo llamas y ovinos (Quispe *et al.*, 2009).
- c) **Condiciones de los dormideros.** Las malas condiciones higiénicas de los dormideros, especialmente en época de parición, en donde los canchones están llenos de barro o con mucho guano (Bustinza, 2000).
- d) **Suministro de biberón.** En caso de las crías huérfanas o “chitas” un factor predisponente también puede ser el inadecuado suministro del biberón o su suministro en malas condiciones higiénicas (Bustinza, 2000).
- e) **Caminatas.** Las rotaciones de dormideros, viajes largos, caminatas, transporte para los re poblamientos en áreas o zonas diferentes causa tensión y estrés en

los animales, lo cual también los hace predispuestos (Zavaleta, 1991). Ya que en las caminatas las crías siguen a sus madres, acompañándolas así en las diferentes actividades ganaderas ya sean baños, dosificaciones, esquila, entre otras (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001).

- f) **Suministro de calostro.** Las crías, debido al excesivo frío, lluvia o nieve no pueden mamar a la madre el calostro (Pizarro, 1999; Bustinza, 2000), lo cual ocasiona debilidad y deficiente inmunidad pasiva en la cría (Ramírez *et al.*, 1998). Se debe tener especial atención con el consumo de calostro y leche en las crías, procurando que sea adecuado, de lo contrario suplementar y disponer de pastos para los adultos (Sepúlveda, 2011). La ingestión del calostro debe ser dentro de las primeras 72 horas de vida del recién nacido (Pizarro, 1999); se ha encontrado asociación entre los procesos neumónicos y niveles bajos de Ig G (9-15mg/ml) en crías menores de 21 días de edad (Garmendia *et al.*, 1987; Ramírez *et al.*, 1998). Según un estudio realizado por Garmendia *et al.*, (1987, 1990), encontraron que la mayoría de casos de crías muertas por neumonía. Registraron niveles de Ig relativamente bajos. Es decir que hubo fallas completa o parcial en la transferencia de dichas inmunoglobulinas a través del calostro. Existe una estrecha correlación entre la mortalidad de crías por estas neumonías en particular, y la concentración de anticuerpos en el suero sanguíneo (Ameghino *et al.*, 1991).
- g) **Época del año.** El periodo de parición de las alpacas es en los meses de Enero a Marzo, por las condiciones de clima de puna, es en esa época en donde hay fuertes vientos, haciéndose más resistentes a partir de los dos meses de edad por el desarrollo del vellón que las protege (Pizarro, 1999; Bustinza, 2000).
- h) **Condiciones medioambientales.** Estrés por frío excesivo, lluvias excesivas, nevadas, heladas (Ameghino *et al.*, 1991; Ramírez *et al.*, 1998; Pizarro, 1999; Bustinza, 2000), conllevan a un enfriamiento ambiental y partos distócicos (Ramírez *et al.*, 1998; Bustinza, 2001), especialmente en las crías recién nacidas, que son las más susceptibles, pues se ha observado que por esta causa mueren el 1.96 de las crías de alpacas (Bustinza, 2000). En el estudio realizado por Carbajal, Zegarra y Menéndez, en 1974, se observó que en el año 1972 la mortalidad de las crías fue mayor que en 1973, no obstante en aquel año llovió más, en consecuencia debía haber más pasto y las madres podían alimentar mejor a sus crías (Bustinza, 2000). Es necesario señalar, que las alpacas normalmente no paren en días lluviosos, y sólo lo hacen por la mañana, hasta la 1 p.m., nunca de noche, ni por la tarde, como un mecanismo de adaptación

biológico, a las condiciones extremas de clima, ya que en la alta puna, la temperatura puede descender por debajo de los 15°C, inclusive en época de lluvias, donde la diferencia térmica no es tan extrema, como ocurre, en épocas de secas, en donde la temperatura ambiental, baja por debajo de los - 5°C por la noche, además de correr fuertes vientos (Bustinza, 2000).

3. Agentes involucrados

Las neumonías en realidad son un complejo en el cual intervienen varios agentes infecciosos (Bustinza, 2001; Huanca, 1991) entre éstos pueden estar involucrados virus, bacterias, hongos, etc. (Pizarro, 1999; Bustinza, 2000). Sin embargo, la especie bacteriana *Pasteurella multocida* ha sido aislada de tuis y adultos con procesos neumónicos (Huanca *et al.*, 2007).

En ovinos, las neumonías agudas bacterianas son generadas por *M. haemolytica*, siendo los serotipo A y T los más reconocidos. El serotipo A está asociado a los cuadros típicos de pasteurelosis, mientras el serotipo T es asociado a los cuadros de toxemia y bacteremia en corderos (Gilmour, 1978).

En el Perú se han identificado bacterias asociadas a cuadros neumónicos agudos, estos géneros bacterianos aislados varían con el área geográfica de crianza (Ramírez *et al.*, 1998). Se han aislado *P. multocida* y *M. haemolytica* de tejido pulmonar de ovinos (Rosadio, 1990) y alpacas (Calsin, 2008; Rosadio *et al.*, 2011), confirmando los reportes previos de la presencia de estas bacterias en casos de neumonías agudas en el Perú.

La especie bacteriana *Pasteurella multocida* ha sido aislada mayormente en procesos neumónicos (Huanca, 1991; Bustinza, 2001). Se ha aislado de tuis y adultos, aparentemente normales (Rodríguez y Mimbela, 1980; Barsallo, 1985); así como de cuadros neumónicos de crías (Ameghino y Calle, 1989) en la región altoandina (Ramírez *et al.*, 1998). Este es el microorganismo directamente comprometido en la presentación de los procesos neumónicos de crías de alpaca y probablemente también se encuentren *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* entre otros agentes (Bustinza, 2001).

Barsallo *et al.* 1984 señalan el aislamiento de *Escherichia coli* de parénquima pulmonar neumónico; sin embargo, tal hallazgo parece estar asociado a cuadros de Colibacilosis séptica (Ramírez, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). En camélidos de mayor edad, tuis y adultos podrían estar involucrados microorganismos del género *Mycoplasma* (Hung *et al.*, 1988).

De acuerdo a estudios serológicos en alpacas (Rivera *et al.*, 1987; 1990) se ha identificado la presencia de animales seroreactores a ciertos agentes virales de localización pulmonar, como lo son la parainfluenza 3 y el virus respiratorio sincitial bovino en neumonías (Sharp, 1983; Blood *et al.*, 1988), aun siendo leves lesiones se sabe que éstas pueden favorecer el ingreso de microorganismos oportunistas como *Pasteurella* entre otros. La presencia de anticuerpos contra éstos microorganismos en los camélidos domésticos refleja su crianza mixta con vacunos y ovinos en el altiplano andino (Fernández Baca, 1991 y Ramírez *et al.*, 1998). En otras especies animales, las neumonías pueden ser causadas por diversos agentes tales como los del género *Chlamydia*, *Mycoplasma* y otros actúan como invasores secundarios (Kymberling, 1988; Blood *et al.*, 1988).

3.1 Familia Pasteurellaceae

Según Jean Euzéby's *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature* la familia *Pasteurellaceae* está constituida por 12 géneros, de los cuales *Pasteurella* es el género tipo. Todos los miembros de este género son microorganismos gran negativos, aerobios-anaerobios facultativos, no esporulados e inmóviles (Leotta *et al.*, 2006).

Entre las bacterias de la familia Pasteurellaceae destacan *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. En ovinos *M. haemolytica* (antes *P. haemolytica*) es considerado como el principal agente etiológico en la Pasturelosis neomónica ovina (Gilmour y Gilmour, 1989), mientras que otros casos de Pasteurelosis neumónica son causados por *P. multocida* (Quinn *et al.*, 2002).

Las bacterias de la familia Pasteurellaceae son en su mayoría ubicuas y forman parte de la microbiota normal del tracto respiratorio, digestivo y reproductivo de varias especies de mamíferos, aves, reptiles y el hombre (Christesen *et al.*, 2003). El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies bacterianas comparten un cierto número de características, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente (Jaramillo *et al.*, 2009). Algunos microorganismos han sido reclasificados después de llevar a cabo estudios de hibridación de ADN y de secuenciación del ARNr 16S (Quinn *et al.*, 2002). De estos géneros, 3 de ellos son los involucrados en el complejo neumónico en otras especies.

- 3.1.1 **Género *Pasteurella*.** Los microorganismos del género *Pasteurella* constituyen las bacterias más frecuentemente aisladas de los procesos neumónicos de los animales (Jaramillo- Arango *et al.*, 2009). Las especies del género *Pasteurella* son comensales habituales del tracto respiratorio

superior de los rumiantes domésticos y silvestres. *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* con mucha frecuencia se encuentran asociadas con enfermedades respiratorias, hay variaciones entre las diferentes cepas en su capacidad para producir enfermedad en los diferentes huéspedes animales (Highlander, 2001; Jaworski, 1998).

El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente (Jaramillo-Arango *et al.*, 2009). Son bacilos pequeños o cocobacilos, gram negativos, sin movimiento, no forman espora, anaerobios facultativos y fermentativos (Carter, 1985; Quentin *et al.*, 1991), que forma parte de la flora orofaríngea de muchos animales (Weber *et al.*, 1984; Félix *et al.*, 2003). Se caracterizan por producir catalasa, citocromo oxidasa e indol; reducir nitrato; utilizar glucosa, manosa y sacarosa (Koneman, 1999); no crecer en agar Mac Conkey y no producir hemólisis ni ureasa (Quentin *et al.*, 1991; Koneman, 1999). La especie tipo del género *Pasteurella* es *P. multocida*, la cual se divide en tres subespecies según su capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol: *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* y *P. multocida* subsp. *gallicida* (Koneman, 1999).

Los esquemas de tipificación utilizados con mayor frecuencia para *P. multocida* incluyen 5 tipos capsulares (A, B, D, E, F) y 16 serotipos somáticos (1-16), a partir de las diferencias serológicas de los lipopolisacáridos de la pared celular (Brogden y Packer, 1979; Heddlestone *et al.*, 1972; Namioka y Murata, 1961).

3.2 Complejo *Pasteurella haemolytica*

Hay una clara evidencia de que las especies no están estrechamente asociadas con *Pasteurella multocida* (Angen *et al.*, 1997). *Pasteurella haemolytica* ha sido sometida a una extensa reclasificación; originalmente fue llamada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt, en 1885 (Zecchinon, 2005; Highlander *et al.*, 2000) posteriormente, en 1896, Flugge la renombra *Bacillus bovisseptica* (Highlander *et al.*, 2000) y, en 1932, Newson y Cross proponen el nombre de *Pasteurella haemolytica* (Zecchinon *et al.*, 2005; Highlander, 2001; Angen *et al.*, 1999).

Entre 1959 y 1961, Smith describe dos biotipos de *P. haemolytica* sobre la base de características fenotípicas y de diferencias epidemiológicas y patológicas, clasificándolas como A y T, según su habilidad para fermentar la L-arabinosa o la trealosa, respectivamente (Zecchinon, 2005; Highlander, 2001; Angen *et al.*, 1999; Biberstein, 1978; Fraser *et al.*, 1983;

Boyce *et al.*, 2004). En 1960 Biberstein *et al.* desarrollaron un sistema de serotipificación basado en la hemoaglutinación indirecta (HAI) de antígenos capsulares solubles (Angen *et al.*, 1999; Biberstein, 1960) y, en 1962, Biberstein y Gills informaron sobre una asociación consistente entre los serotipos y los biotipos que establece una serotipificación capsular (Angen *et al.*, 1999; Biberstein, 1978). En investigaciones subsecuentes, el número de serotipos reconocidos aumentó a 17 (Angen *et al.*, 1999; Fodor *et al.* 1988; Frank *et al.*, 1978; Sutherland *et al.*, 1986). Los serotipos 3, 4, 10 y 15 asociados con el biotipo T que fermenta trehalosa y son los causantes de septicemia en ovinos (Sutherland y Redmond, 1986); el resto con el biotipo A. Las cepas no tipificables por HAI fueron clasificadas posteriormente por inmunoelectroforesis, demostrándose nueve serogrupos adicionales (Angen *et al.*, 1999).

En 1990, a partir de los resultados obtenidos en estudios sobre hibridación ADN-ADN, propiedades bioquímicas y análisis genéticos, los serotipos T3, T4, T10 y T15, del biotipo T, fueron reclasificados como una especie separada que se denominó *Pasteurella trehalosi* (Sneath *et al.*, 1990). En 1995, Younan y Fodor informaron sobre el aislamiento de *P. haemolytica* serotipo 17 (A17). En 1999, mediante estudios de ribotipificación, electroforesis de enzimas multi-locus, secuenciación del gene 16S del ARNr e hibridación ADN-ADN, los serotipos de *P. haemolytica* A fueron reclasificados en el nuevo género *Mannheimia*. En consecuencia, los anteriores serotipos A de *P. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) fueron renombrados como *Mannheimia haemolytica* (Oystein *et al.*, 1999; Angen *et al.*, 1999).

Dando así inicio a un nuevo género, *Mannheimia*, el cual alberga el biotipo A de los organismos del viejo complejo *Pasteurella haemolytica* con 5 especies: *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia ruminalis* y *Mannheimia varigena* (Angen *et al.*, 1999), así como en la actualidad una taxa sin nombre (Blackall *et al.*, 2001).

3.2.1 *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica (*haima* sangre; Gr. *lyo* perdido, disuelve ica fem. se refiere a la hemólisis observada en agar sangre). Corresponde a [*P.*] *haemolytica* biogrupo 1 (Bisgaard & Mutters, 1986). *M. haemolytica* es el agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes (Aley *et al.*, 1977), la primera información del problema apareció en 1921, donde se aisló el germen de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de *Pasteurella haemolytica* (Biberstein, 1978; Merchant, 1994; Carter, 1985).

Algunos serotipos de *M. haemolytica* forman parte de la microbiota normal de la cavidad nasofaríngea de los rumiantes, pero bajo situaciones que alteran los mecanismos de defensa pulmonar del hospedador logran establecerse en el aparato respiratorio bajo y causar daño al tejido pulmonar (Aguilar *et al.*, 1989).

Se aísla normalmente de procesos neumónicos en bovinos y ovinos, y también de procesos septicémicos en borregos y de mastitis en ovejas, aunque con frecuencia es difícil su aislamiento (Murphy *et al.*, 1993; Angen *et al.*, 1999; Boyce *et al.*, 2004). En bovinos que desarrollan pasteurelosis neumónica, probablemente haya portadores sanos de la cepa de *Mannheimia hemolytica* que causa la neumonía, o es posible que sean cepas adquiridas de otros animales (Murphy *et al.*, 1993). En los bovinos sanos es común que el serotipo A2 esté presente en el tracto respiratorio superior, pero después de un estado de estrés o de una infección viral, el serotipo A1 rápidamente reemplaza al A2 como el serotipo principal; esto probablemente se deba a una transmisión horizontal a partir de animales enfermos que tengan el A1 activo en secreciones nasales (Zecchinon *et al.*, 2005; Highlander, 2001); sin embargo, se han reconocido 17 serotipos como patógenos y representan el 90% de los aislamientos. El otro 10% permanece como no tipificable y se duda de su patogenicidad (Trigo, 1998). Los estudios realizados en México han demostrado la mayor importancia de los serotipos A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos (Binkharst *et al.*, 1990).

Otros estudios serológicos sugieren que es posible que ocurra la transmisión interespecie de *Mannheimia hemolytica* desde animales domésticos hacia animales silvestres o de vida libre, o viceversa (Villard *et al.*, 2006). Son cocobacilos gram negativos, no móviles pequeños y redondos (Angen *et al.*, 1999). Las colonias son lisas y grisáceas en agar sangre y tiene 1-2mm de diámetro luego de las 24 horas de incubación. La mayoría de las cepas producen β -hemólisis en agar sangre de bovino (Carter, 1985; Angen *et al.*, 1999). Sus características bioquímicas importantes se resumen en el cuadro 2. Han sido aisladas en neumonía de becerros y corderos y de septicemia en ovejas y ubres mastíticas. Algunos de los serotipos son probablemente microflora del tracto respiratorio superior de rumiantes (Frank, 1989; Gilmour y Gilmour, 1989).

3.2.2 *Mannheimia glucosida*

Mannheimia glucosida (relativo a los glucósidos que son fermentados por casi todos los serovares- Angen *et al.*, 1997). Pertenece al serotipo 11 restante del complejo *Pasteurella haemolytica*, no está relacionado con *Mannheimia haemolytica*, se renombró como *Mannheimia glucosida* (Angen *et al.*, 1999; Zecchinon *et al.*, 2005; Lo Ry, 2001; Highlander, 2001).

Corresponde al tercer taxón de Frederiksen [*P.*] *haemolytica* (Frederiksen, 1973), clasificada como [*P.*] *haemolytica* biogrupos 3 y 5 por Bisgaard & Mutters (1986) y reclasificada como [*P.*] *haemolytica* biogrupos 3A-3H. Estas cepas muestran una similitud de 85% en sus ADN, lo cual las incluye en la misma especie. Los diferentes biovares mostrados en la tabla 3 están relacionados pero aun así son distintos, previas hibridaciones ADN-ADN solo incluyen representantes de los biogrupos 3A, 3G, 3H Y 9 (Mutters *et al.*, 1986) y su baja unión de valores de ADN. Sin embargo, incluyendo cepas representativas adicionales variaciones genéticas y fenóticas se encontró que los biogrupos 3B y 3C están vinculados a los diferentes subgrupos juntos como un grupo homólogo de DNA (Angen *et al.*, 1999).

Esta especie también incluyen cepas inositol positivas de [*P.*] *haemolytica* biogrupo 9 (Bisgaard y Mutters, 1986). Este grupo de bacterias es normalmente no asociado con las condiciones de la enfermedad y probablemente representa parte de los residentes de la microflora del respiratorio superior (Biberstein y Gills, 1962). Todas las cepas investigadas han sido aisladas de ovejas, aunque se han reportados algunos aislamientos de terneros (Quirie *et al.*, 1986) y en otros estudios de cavidad nasal de borregos, en algunos casos con neumonías u otras enfermedades (Jaramillo- Arango *et al.*, 2009).

Las células son gram negativas, pequeñas, no móviles. Las colonias son grisáceas en agar sangre y tiene 1-2mm de diámetro, todas las cepas fermentan D-sorbitol, D-xylosa, maltosa, dextrina, entre otras características bioquímicas detalladas en el cuadro 2.

Cuadro 2. Angen *et al.* 1997. Separación fenotípica de especies y taxas del género *Mannheimia*, correspondiente al complejo [*Pasteurella*] *haemolytica* trehalosa negativo.

Prueba	<i>Mannheimia</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Lonepinella</i>
Hemólisis	d	d	-	d	-
Factor de dependencia V	-	d	d	+	-
Factor de dependencia X	-	-	-	+	-
VP, 37°C	-	-	-	-	+
Ureasa	-	+	d	d	-
Ornitina descarbolixasa	d	-	d	d	-
Indol	-*	-	++	d	-
L- Arabinosa	d	d	-	-	d
Glucosidasa	d	d	-	-	d
Mannitol	+	d	d	-	-
D-Manosa	-	d	+	d	desconocido
D-Melibiosa	-*	d	-	-	d
Meso-Inositol	d	-	-	-	-
D- Sorbitol	d	-§	d	-	desconocido
Trealosa	-	d	d	-	desconocido
ONPF (α -fucosidasa)	D	-	-	-	desconocido

(+) Solo reacción positiva; (-) sólo reacción negativa; (d) + ó -; *Puede haber varación; +*P. avium* indol negativo; §Taxon 9 de Bisgard positivo tardío.

3.3 Características del género *Mannheimia*:

Mannheimia (nombrada así en tribute a Walter Mannheim, biólogo Alemán de cuyas investigaciones han mejorado nuestro entendimiento de la taxonomía de la familia Pasteurellaceae). *Mannheimia* es un nuevo género dentro de la familia Pasteurellaceae (Pohl, 1979). Se trata de un cocobacilo no móvil gram negativo que no forma endosporas, es de crecimiento mesófilo y anaeróbico facultativo o microaerófilico. Fermenta glucosa sin producción de gas, la reacción de oxidasa normalmente es positiva pero puede ser variable. Positivo a test de fosfatasa y reduce nitrato. Al test de citrato de Simmon's es negativo así como el de arginina deshidrolasa. Todas sus especies fermentan manitol (Angen *et al.*, 1999; Vadillo *et al.*, 2002).

Es negativa a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa, Voges-Proskauer. Crece en agar MacConkey, en medios enriquecidos como agar chocolate o agar sangre, formando colonias lisas de color blanco grisáceo, con tamaños de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 h de incubación. No fermentan arabinosa o glucósidos ni ornitina descarboxilasa, pero positivas a ONPG (α -fucosidasa) y NPG (β -glucosidasa). La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas la hacen parcialmente resistente a fagocitosis (Angen *et al.*, 1999; Boyce *et al.*, 2004).

3.4. *Biberstenia trehalosi*

Pasteurella trehalosi es un patógeno importante en ovejas, estando primariamente asociado con serias infecciones sistémicas en corderos pero también teniendo una asociación con neumonías en ovejas (Gilmour y Gilmour, 1989). El organismo, primero descrito como una especie separada por Sneath & Stevens (1990), fue parte del complejo de especies una vez conocida como el complejo *Pasteurella haemolytica* (Angen *et al.*, 1999), que estaba integrado por los biotipos A y T (Smith, 1959) y ha sido extensivamente reorganizado.

Recientemente, *P. trehalosi* ha sido reclasificada como *Bibersteinia trehalosi* por Blackall *et al.*, 2007, en un estudio con 42 campos aislados: 21 de oveja, 14 de terneros, 1 de Cabra, 3 de roedores y de fuentes desconocidas 3, teniendo como resultado la cepa tipo para *B. trehalosi*. Hay evidencia de diversidad dentro de las especies de *B. trehalosi*. Un esquema basado en los polisacáridos capsulares originalmente desarrollado por Biberstein *et al.* (1960), reconoce 4 serovares T3, T4, T5 y T15 (Adlam, 1989; Gilmour & Gilmour, 1989). Davies y Quirie (1996) encontraron 6 tipos de lipopolisacáridos y 4 de proteínas de membranas externas de 60 aislados principalmente de oveja en Reino Unido y notaron que esto representaba sólo un grado limitado de diversidad.

3.4.1 Características del género *Biberstenia*. Como las pruebas fenotípicas y genotípicas apoyaron la separada y distinta naturaleza de estos organismos, Blackall *et al.*, 2007 propusieron la transferencia de *P. trehalosi* a un nuevo género, *Biberstenia* en honor a Ernst L. Biberstein, quien se dedicó bastante a los primeros trabajos de caracterizaciones en este organismo, incluyendo la creación del esquema de serotipificación y algunas de los primeros estudio de relacionamiento de DNA-DNA que indican la naturaleza única de su taxa, *Biberstenia trehalosi* puede ser distinguida de los géneros existentes de la familia por la conservación de sólo nueve características; catalasa, porfirina, ureasa, indol, fosfatasa, acido de dulcitol, (+)-D-galactosa, (+)-D-manosa y (+)-trehalosa.

4. Epidemiología

La alta incidencia de neumonías en los primeros días de nacidos hace pensar que quizás podrían deberse a la aspiración de líquido amniótico al momento del parto, o de leche por falsa deglución (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001); o quizás también por el pasaje de medicamentos, a través de la tráquea, en los casos en que se emplean administraciones orales contra ciertas afecciones de los neonatos. Esto aún no ha sido bien estudiado en crías de alpacas (Bustinza, 2001).

En muchas empresas alpaqueras de Puno se registran como causa de mortalidad, cuadros de septicemia y procesos infecciosos acompañados de fiebre, que en realidad no han sido muy bien estudiados, y quizás podrían corresponder a verdaderos procesos de pasteurelosis en su forma septicémica (Ameghino *et al.*, 1991).

Un estudio muestran que en algunas empresas alpaqueras de Puno, las neumonías constituyen la principal causa de muerte de las crías de alpaca (Ameghino, 1986, 1987, 1988, a, b; Ameghino y Calle, 1989). Otro estudio Realizado por Fernández Baca en 1991 se puede apreciar que en Lima hay mayor prevalencia de *Mannheimia haemolytica* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia relativa (%) de bacterias aisladas de procesos neumónicos en crías de alpaca

Bacteria	Frecuencia	Localidad	Referencia
<i>Pasteurella multocida</i>	42%	Puno	Ameghino y Calle (1989)
	55%	Puno	Barsallo <i>et al.</i>
<i>Pasteurella haemolytica</i>	100%	Lima	Ramírez, Común. Personal (1990)

Fuente. Fernández Baca, 1991. Avances y perspectivas de los CSA.

En un estudio realizado con 26 muestras de casos diagnosticados en el campo como muertos por neumonía en cría de alpaca, se aisló *P. multocida* en 11 de ellas (42.3%) procedentes de dos empresas asociativas del departamento de Puno (Ameghino y Calle, 1989) cuadro 3. Por dichos hallazgos se ha planteado que este microorganismo está comprometido en la ocurrencia de estos procesos pulmonares, incluyendo posteriormente la participación de *M. haemolytica* en estos procesos (Ameghino y DeMartini, 1991).

5. Patogenia

5.1 Transmisión

Tanto los microorganismos del Género *Pasteurella* y otras bacterias, de localización pulmonar, son transmitidos a través del aire, a partir de los portadores sanos, que pueden ser las propias madres, en la que generalmente se albergan en la región naso-faríngea (Rodríguez y Mimbela, 1980; Barsallo, 1985). Una vez que afecta un animal, ya que es vía aerógena, se transmitirá vía horizontal, es decir de una cría a la otra (Ramírez *et al.*, 1998), dependiendo de los factores ya antes mencionados.

5.2 Patogenicidad

En infecciones por *M. haemolytica*, el factor fundamental en la inducción de la neumonía es la leucotoxina que influye en la respuesta inmune del hospedador. Diversos estudios han intentado comprender qué mecanismos desencadenan el paso de *M. haemolytica* del comensal al patógeno. Entre los eventos claves se encuentran los factores predisponentes y las infecciones con virus y *Micoplasmas spp* (Rice *et al.*, 2008).

Los mecanismos de patogenicidad de algunos de los miembros de la familia *Pasteurellaceae* no están aún muy claramente definidos ya que algunos de los mecanismos que le permiten a *M. haemolytica* establecerse y diseminarse durante la infección, no están esclarecidos satisfactoriamente, incluso existe la posibilidad de que haya diferencias en dichos mecanismos entre las cepas aisladas de diversos cuadros neumónicos, así como de cepas procedentes de animales sanos (Lo, Ry, 2001; Highlander, 2001; Highlander *et al.*, 2000). Una vez que *M. haemolytica* desciende al pulmón y se instaura la infección, los factores de patogenicidad de las bacterias y la respuesta inmune generan una bronconeumonía fibrinosa.

5.3 Patogénesis

En casos de camélidos la patogénesis de los agentes infecciosos aún no es muy conocida (Fernández Baca, 1991). El complejo se inicia con algún tipo de estrés en el animal susceptible,

a menudo se complica con infecciones bacterianas (Fernández Baca, 1991). Como ocurre en otras infecciones en bacterias gram negativas, es indudable que las endotoxinas juegan un papel en la patogenia (Carter, 1985). Tanto *P. multocida* como *M. haemolytica* son miembros de la flora bacteriana de las membranas de la mucosa oral y nasofaríngea normales, con predominio de la primera generalmente. Los brotes de estas enfermedades se producen cuando fallan los mecanismos de defensas locales o sistémicas y cepas virulentas de pasteurelas desarrollan una proliferación masiva previa invasión de la mucosa nasofaríngea o a la inhalación numerosa hacia el pulmón y se multiplican de forma logarítmica, el animal que ya se encuentra bajo alguna situación de estrés, bajas defensas o cualquier otro factor que lo desate, puede desarrollar la neumonía (Yates, 1982).

La proliferación de pasteurelas produce y secreta una leucotoxina que se comporta como un modulador de leucocitos. En concentraciones bajas activa los neutrófilos y monocitos haciendo que se liberen mediadores inflamatorios y superóxidos al producirse la degranulación, se estimulan los macrófagos alveolares, capaz de amplificar los depósitos de fibrina. En concentraciones más altas provoca rápidamente la hinchazón y lisis de leucocitos. Como resultado de todo ello se produce una grave inflamación pulmonar, que forma parte del complejo respiratorio bovino (Vadillo *et al.*, 2002).

6. Signos clínicos

En animales menores de tres semanas, la presentación generalmente es hiperaguda (Pizarro, 1999) el curso que sigue la enfermedad es muy rápido, con congestión variable según la intensidad con que actúan los microorganismos, se puede observar respiración disneica, salivación espumosa, fluye una secreción por la nariz y boca (Rodríguez *et al.*, 1980).

Se presenta en camélidos de pocos días o semanas de edad (Ramírez *et al.*, 1991), generalmente los animales amanecen muertos, no obstante haber estado aparentemente saludables el día anterior (Ameghino *et al.*, 1991; Fernández Baca, 1991; Bustinza, 2001). Generalmente amanecen muertos después de un día lluvioso o después de una fuerte helada, las crías que sobreviven, presentan respiración dificultosa y generalmente respiran con la boca abierta (Bustinza, 2000).

En casos no severos pueden observarse algunos signos como depresión, anorexia, orejas dirigidas hacia atrás o caídas; puede o no haber secreción nasal, tos, elevación de temperatura (40 – 41°C) y respiración superficial (Fernández Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1991; Huanca,

1991; Pizarro, 1999; Bustinza, 2001). Otros animales se rehúsan a comer, además se puede observar exudado mucopurulento en las fosas nasales (Ramírez *et al.*, 1998). A la auscultación se aprecia estertores por la presencia de exudado en los conductos aéreos. La muerte de los animales afectados puede ocurrir entre 1 y 3 días después de aparecer las manifestaciones clínicas, y ésta se produce probablemente debido a la toxemia a partir de las lesiones pulmonares o por hipoxia pulmonar (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001).

Las manifestaciones clínicas generalmente se relacionan con su localización pulmonar, que podría confundirse con lo que también ocurre en la neumonía necrótica por *Fusobacterium necrophorum* pero en esta última además existen lesiones en la boca, glotis, lengua, carrillos internos y otras partes. Así mismo la neumonía pasteurelósica puede confundirse con la que se observa por falsa deglución principalmente entre crías huérfanas o abandonadas, alimentadas artificialmente con biberón, en este caso hay que tener en cuenta los antecedentes clínicos (Novoa *et al.*, 1991). En las crías mayores de edad, puede observarse respiración ronca a la auscultación, que generalmente es de origen parasitario (*Dyctiocaulus filaria*), conocida como “ICHU KURU” en Quechua y de “ICHU LAGO” en Aymará (Bustinza, 2000).

7. Diagnóstico

El diagnóstico de la neumonía aguda está basado en los aspectos clínicos, patológicos y microbiológicos (Fernández Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998; Bustinza, 2001). Las bacterias, producen en el animal afectado, síntomas que pueden ser identificados por los Criadores, Pastores, Sanitarios y Médicos Veterinarios, para poder hacer un diagnóstico presuntivo (Bustinza, J., 2000). Éstos casos se presentan en camélidos de pocos días o semanas de edad (Huanca *et al.*, 2011).

7.1 Historia clínica

El diagnóstico se inicia con la historia clínica, está se basa en los aspectos clínicos de la enfermedad. En muchos neonatos no se observan manifestaciones clínicas pero son hallados muertos a la inspección de la majada (Fernández Baca, 1991).

7.2 Diagnóstico Bacteriológico

El examen bacteriológico de laboratorio permitirá identificar al microorganismo responsable y dará el diagnóstico definitivo (Ameghino *et al.*, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Esto se logra cultivando, aislando y tipificando al agente bacteriano así como describiendo las lesiones microscópicas y macroscópicas, que han producido en el hospedero (Bustinza, 2000).

Toma de muestra para diagnóstico bacteriológico. Las muestras idóneas para el examen de laboratorio a partir de animales vivos son los aspirados traqueo bronquiales, hisopos nasales (Quinn *et al.*, 2002). En caso de animales muertos, la remisión de muestras tomadas asépticamente, para el examen bacteriológico, deben enviarse en refrigeración, glicerina tamponada estéril en tubos o torundas conteniendo medios de transporte (Bustinza, 2001). Las muestras consistirán en pedazos de pulmones, corazón y ganglios linfáticos mediastínicos. Si fuera posible, es mejor remitir un animal enfermo al laboratorio especializado más cercano (Ameghino *et al.*, 1991).

Aislamiento. Para el aislamiento y fenotipificación se utiliza el cultivo ‘*in vitro*’ en medios a base de agar sangre, además de pruebas bioquímicas, todo lo cual permite determinar la morfología de las colonias, la producción de hemólisis, así como su comportamiento bioquímico para efectos de su identificación y biotipificación (Angen *et al.*, 1999; Biberstein, 1978). También se sugiere cultivar en agar Mc Conkey. Ambas placas se cultivan en anaerobiosis a 37°C durante 24-48 horas. Se puede recurrir al empleo de agar sangre, suplementado con neomicina, bacitracina y actidiona, para el aislamiento de *P. multocida* a partir de muestras muy contaminadas (Quinn *et al.*, 2002). Evaluar características de las colonias, crecimiento en agar McConkey, además de pruebas bioquímicas, todo lo cual permite determinar la morfología de las colonias, la producción de hemólisis, así como su comportamiento bioquímico para efectos de su identificación y biotipificación (Angen *et al.*, 1999; Biberstein, 1978). Además de los métodos convencionales para identificación bioquímica de *M. hemolytica*, se dispone de otros métodos alternativos, que se basan en sistemas miniaturizados disponibles comercialmente y que facilitan y agilizan la fenotipificación; entre ellos se encuentra el sistema API 20E y 20NE, que se han usado como herramienta en la identificación de enterobacterias y no enterobacterias en medicina veterinaria (Katsuda *et al.*, 2007; Villard *et al.*, 2006; Angen *et al.*, 1999).

Cuadro 4. Características diferenciales para aislamiento bacteriano de agentes causantes de procesos neumónicos en crías de alpacas

Características Diferenciales	<i>Mannheimia Haemolytica</i>	<i>Pasteurella Multocida</i>
Crecimiento en Agar Mc Conkey	+	-
Hemólisis en agar sangre	+a	-
Producción de indol	-	+
Actividad Catalasa	+	+
Actividad Ornitina descarboxilasa	-	+
Ácido D-trehalosa	-	v
Fermentación Manitol	+	+
Fermentación D-sorbitol	+*	+*
Oxidasa	+	+
Movilidad	-	-
B-glucosidasa	-	-
Esculina	-	-

V.Variable. *Con algunas excepciones. a. Babour *et al.* 1997 describe que algunas cepas en el tercer subcultivo pierden la capacidad de producir hemólisis.

7.3 Serotipificación

Para la serotipificación se emplean técnicas de hemoaglutinación mediante la utilización de antisueros de referencia específicos para los 12 serotipos reconocidos (Jaramillo-Arango *et al.*, 2009). Otra prueba serológica que se puede utilizar es la técnica de ensayo visual simple a partir de la obtención de leucotoxina A de aislamientos de *Mannheimia haemolytica*, para determinar la presencia de anticuerpos anti leucotoxina A en el suero de los animales problema; de igual manera, mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia, a partir de proteínas obtenidas de la membrana externa de *Mannheimia haemolytica*, que se emplean como antígenos para determinar el patrón de reconocimiento por anticuerpos contra dichos antígenos (Biberstein, 1978).

Los métodos fenotípicos para la caracterización de las especies de *Mannheimia* se han utilizado durante mucho tiempo y aunque se acepta que su reproducibilidad es alta, sus limitaciones ya han sido reconocidas ampliamente (Angen *et al.*, 1999; Chaslus-Dacla *et al.*, 1996). En estudios realizados para evaluar la especificidad de la serotipificación como una herramienta diagnóstica, se ha demostrado que no es un método confiable para la correcta identificación de *Mannheimia haemolytica*, y se hace énfasis sobre la necesidad de una amplia caracterización fenotípica y genotípica para la adecuada tipificación de este microorganismo, considerando las dificultades que han presentado otros estudios para su clasificación, basada solamente en la fenotipificación y la serotipificación (Angen *et al.*, 1999; Derosa *et al.*, 2000) teniendo en cuenta que el género *Mannheimia* abarca taxones de una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica (Angen *et al.*, 1999). Diversas técnicas de biología molecular han demostrado su utilidad en el estudio de la taxonomía, patogénesis y epidemiología de *Mannheimia haemolytica*. Entre las técnicas empleadas en diversas investigaciones sobre la epidemiología molecular de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* se pueden destacar las siguientes: análisis de restricción para la detección de los genes del ARNr o ribotipificación, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de endonucleasas de restricción (REA) del ADN cromosomal, hibridación de ADN-ADN, electroforesis de enzimas multilocus (EEML), amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD), secuenciación del ADN, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Angen *et al.*, 1999, 2002; Derosa, 2000). Todos estos métodos tienen como base el estudio del polimorfismo del ADN bacteriano y se ha demostrado su alto poder de discriminación para la diferenciación de cepas, superior a los métodos convencionales de tipificación fenotípica (Angen *et al.*, 1999; Maslow, 1993; Liu, 1999).

8. Hallazgos de Necropsia

La clasificación de las neumonías en Medicina Veterinaria ha sido hecha considerando distintos aspectos tales como: la etiología (p.e. neumonía viral, pasteurelosis neumónica, neumonía alérgica, entre otros), la epidemiología (p.e. neumonía enzoótica, pleurumonía contagiosa bovina), tipo de exudado (neumonía supurativa, fibrinosa o granulomatosa) o distribución topográfica (lobar, difusa, focal, entre otras). Sin embargo la clasificación morfológica es más útil. Clasifica las neumonías en tres categorías principales: **bronconeumonía, neumonía lobar y neumonía intersticial**. La importancia de esta clasificación radica en que aporta los datos más importantes relativos a la patogenia y la probable causa de la neumonía (Jubb, 1990).

Bronconeumonía: Lo que la define, tal como indica su nombre, es que la inflamación se origina en la unión bronquiolo-alveolar. Generalmente involucra las regiones craneoventrales de los pulmones. La principal causa de las bronconeumonías son bacterias, más comúnmente luego que las defensas pulmonares hayan sido disminuidas por una infección viral, estrés severo u otros factores predisponentes. **Neumonía lobar:** Como el término implica, en la neumonía lobar se afecta uno o más lóbulos en su totalidad o en su mayor parte: están consolidados de manera difusa y uniforme. Del punto de vista patogénico, las neumonías lobares son neumonías fulminantes, rápidamente confluyentes, en la cual no hay evidencia de orientación y difusión bronquial. Dado que la neumonía lobar puede considerarse como una bronconeumonía fulminante, se deduce que los factores patogénicos de ambas neumonías son similares. **Neumonía intersticial:** La lesión difusa o en manchas de los tabiques alveolares es la característica esencial. Puede ser causada por diversas formas agresión pulmonar. Se han considerado inflamaciones crónicas, en las cuales predomina una respuesta proliferativa que involucra a las paredes alveolares y al estroma que las sostiene (Jubb, 1990).

En la actualidad las neumonías en el campo de la Medicina Veterinaria se clasifican en cuatro: bronconeumonía (supurativa y fibrinosa), neumonía intersticial, neumonía granulomatosa y neumonía embólica basándose en los cambios morfológicos, incluidos distribución, textura, color y apariencia de los pulmones afectados (MacGavin y Zachary, 2007).

En camélidos sudamericanos se observan cuadros septicémicos, los que probablemente correspondan a la fase hiperaguda de pasteurelosis. Algunas veces hay eliminación de sangre por las fosas nasales. Existen petequias en las subserosas debajo del epicardio y endocardio (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001). También puede encontrarse estas mismas lesiones en

el hígado, bazo y ganglios linfáticos (Ameghino *et al.*, 1991), los pulmones congestionados o con focos neumónicos en la región cráneo-ventral, en la etapa inicial de la neumonía, la zona afectada se encuentra congestionada, firme, de aspecto brillante con incremento de peso (Ramírez *et al.*, 1998), es posible encontrar un exudado mucoso en la tráquea, los nódulos linfáticos se encuentran aumentados de tamaño debido a la congestión (Huanca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Generalmente, las crías muertas no tienen leche en el compartimiento 3 lo que indica que las crías no han mamado (Bustinza, 2000).

Lo más frecuente son los casos de neumonía localizada, que correspondería a la forma neumónica de la pasteurelosis. Incluso puede haber pleuritis, con adherencia fibrinosa a las paredes intercostales internas. También suele haber bronconeumonía, que se caracteriza por la presencia de exudado serofibrinoso o purulento en los bronquiolos y congestión pulmonar o áreas de hepatización (Ameghino *et al.*, 1991). En casos sistémicos se observa congestión y/o hemorragia puntiforme en varios órganos (Ramírez *et al.*, 1998).

Otro tipo de lesiones son las que se observan en la neumonía necrótica de las crías, que generalmente tiene su origen en la falsa deglución de saliva de las que padecen de necrobacilosis bucal causada por *Fusobacterium necrophorum* (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001). En animales jóvenes, mayores de un mes de edad y tuis se puede observar exudado seroso a serofibrinoso en la cavidad torácica y el saco pericárdico; los nódulos linfáticos suelen estar congestionados, edematosos y hemorrágicos (Fernández Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998).

En un estudio realizado con 50 muestras de pulmones de crías muertas por procesos neumónicos, al examen histopatológico se determinaron las siguientes alteraciones: neumonía roja (42%), congestión pulmonar (26%), bronconeumonía (14%), edema pulmonar (6%) y neumonía purulenta embólica (4%); también se verificó la compatibilidad entre estos hallazgos de laboratorio y el clínico (Tapia y Málaga, 1989).

Los hallazgos histopatológicos consisten en severa bronquitis, congestión y edema; en el septum interalveolar se observa la presencia de células polimorfas nucleares (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001). En otros casos las lesiones corresponden a bronco neumonía aguda o subaguda con evidencia también de neumonía intersticial linfocítica. Asimismo, existen casos de neumonía intersticial con pleuritis crónica no supurativa (Ameghino *et al.*, 1991).

9. Tratamiento

El tratamiento de las crías recién nacidas con neumonía, consiste en brindarles estimulantes cardiorespiratorios, abrigándolos, si se pudiera darles de beber agua caliente con azúcar (Bustinza, 2000). Para el tratamiento de los procesos neumónicos, resulta muy práctico inyectarles antibiótico (Bustinza, 2000), el uso de oxitetraciclina de larga acción, que tiene efecto hasta por 5 días. Muchas veces un solo tratamiento es suficiente para la recuperación del neonato. Sin embargo, otros antibióticos, también son efectivos, así como sulfas, nitrofuranos, o combinaciones de éstos (Bustinza, 2001; Novoa *et al.*, 1991).

La administración de antibióticos de efecto prolongado (tetraciclinas sulfatos) es recomendada, a fin de prevenir la infección bacteriana secundaria; en caso de una neumonía aguda, administrar penicilinas (a base de penicilina sódica, potásica y benzatínica) más estreptomicina, también se obtiene buenos resultados con el uso de la enrofloxacin (Redes Sostenibles para la Seguridad Alimentaria-REDESA, 2006).

Las neumonías microbianas comunes, generalmente responden a las 24 horas de iniciado el tratamiento (Novoa *et al.*, 1991). Durante el período de convalecencia, se puede aplicar remedios expectorantes a base de eucalipto, mentol, alcanfor. (Bustinza, 2001; Novoa *et al.*, 1991). En el caso de bovinos, el tratamiento se ha basado en el uso intensivo de antibióticos, incluyendo, además, el tratamiento masivo de hatos, lo cual ha determinado un incremento en la incidencia de cepas multirresistentes de *M. haemolytica*. De ahí que sea preferible una prevención y control de la enfermedad, basada más en la vacunación que en la quimioterapia (Highlander, 2001). La selección de los antimicrobianos a emplear, raramente se basa en estudios previos de sensibilidad ‘*in vitro*’ de cepas aisladas a partir de exudado nasal o traqueal, considerando, además, que estos aislamientos no reflejan necesariamente los microorganismos presentes en el tejido pulmonar (Allen *et al.*, 1991).

Para el tratamiento de la Mannheimiosis bovina se ha empleado una gran variedad de antimicrobianos que incluyen principalmente penicilinas, oxitetraciclina, trimetoprim/sulfadoxina, ampicilina, tilmicosín, florfenicol y tulatromicina, y aunque todos ellos han demostrado eficacia, también se ha podido comprobar la resistencia contra penicilina, ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas y tilmicosín en muchos aislamientos de *M. haemolytica* (Rice *et al.*, 2008).

Según diversos estudios, es difícil conocer la sensibilidad real de los aislados de campo, al ser los microorganismos implicados parte de la flora habitual de la nasofaringe. Las recomendaciones de la NCCLS para rumiantes indica que las pruebas de sensibilidad deberían incluir los siguientes

antibiótico: Ceftiofur, Danofloxacin, Enrofloxacin, Florfenicol, Espectinomycin y Tilmicosin. Cuando las bacterias estudiadas son sensibles a ellos, hay grandes probabilidades de éxito terapéutico (Apley *et al.*, 2006). Cuando intervienen agentes virales en la presentación de la enfermedad no existe tratamiento efectivo (Huanca, 1991).

10. Prevención

Dada la complejidad que involucra la multicausalidad de esta enfermedad, las medidas de prevención y control siguen siendo motivo de análisis y polémica respecto de su eficacia y la eficiencia de la inmunización, el empleo de quimioterapéuticos y el control de factores medioambientales que propician el estrés en los animales y favorecen la acción invasora de *Mannheimia haemolytica* a través de sus complejos mecanismos de virulencia (Jaramillo-Arango, 2009).

No es fácil prevenir las neumonías debido a la modalidad de crianza de alpacas, toda vez que no es posible controlar las condiciones ambientales. Pero sí pueden evitarse algunas condiciones de estrés que predisponen su padecimiento (Ameghino *et al.*, 1991; Bustinza, 2001). En otras especies de animales domésticos se emplean otros productos biológicos como son las bacterinas a base de microorganismo del Género *Pasteurella* (Ameghino *et al.*, 1991). Se puede evitar el exceso de humedad y corrientes de aire frío en los dormideros. Es importante que tengan un corral limpio y seco, lo ideal es construir cobertizos que brinden protección en las noches de frío y lluvia. Separar a los animales enfermos de los sanos (REDESA, 2006).

Es importante que el neonato ingiera calostro (Fernández Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998; Bustinza, 2001) dentro de las 2 primeras horas de nacido (Huanca, 1991), de no ser posible suplementarlo con lo de otra especie ya sea vacuno u ovino (Fernández Baca, 1991; Huanca, 1991; Ameghino *et al.*, 1991) a fin de asegurarles niveles protectores de anticuerpos y protegerlos de las modificaciones climáticas bruscas (Ramírez *et al.*, 1998). Es imprescindible prever la provisión de buenos alimentos para las madres y crías, a fin de generar fortaleza y resistencia (Bustinza, 2001),

Se le debe brindar un manejo sanitario adecuado (Ameghino *et al.*, 1991), es necesario ubicar lugares muy apropiados para establecer las canchas de parición que sean en lugares abrigados de las corrientes de aire, así como con buena disponibilidad de agua y pastos para las madres, de tal modo que tengan bastante leche, así como calostro (Bustinza, 2000). No se cuenta con vacunas satisfactorias para la prevención (Fernández Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Se recomienda

la administración de antibióticos para prevenir la infección bacteriana secundaria (Fernández Baca, 1991).

Es importante mencionar qué para establecer la profilaxis y control de las neumonías en camélidos domésticos deben determinarse los agentes importantes y prevalentes en el área de crianza (Ramírez *et al.*, 1998). En Bovinos existe en el mercado una amplia gama de vacunas, desafortunadamente no hay mucha información publicada en revistas arbitradas que sustenten su eficacia en estudios con desafíos controlados o en condiciones de campo (Highlander, 2001; Bowland *et al.*, 2000).

Aparentemente, estas vacunas sólo aportan una protección parcial, incluso algunas, como las preparadas a base de células íntegras, pueden llegar a incrementar la morbilidad en el hato (Wilkie *et al.*, 1980). Otra estrategia de prevención en lotes de engorda ha sido el empleo de vacunas únicamente contra agentes virales, la cual también ha resultado poco efectiva (Bowland *et al.*, 2000).

El desarrollo de vacunas efectivas contra la Mannheimiosis Bovina depende primordialmente del conocimiento detallado de los antígenos y factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica*, necesarios para estimular una protección inmune. Estos antígenos incluyen componentes de la superficie bacteriana (LPS, OMP) además de moléculas secretadas (leucotoxina) (Highlander, 2001). Se ha podido demostrar correlación entre los títulos de anticuerpos antileucotoxina neutralizantes y la resistencia a la enfermedad; sin embargo, el empleo de la leucotoxina sola, purificada o recombinante, no ha sido suficiente para originar protección (Purdy *et al.*, 1993). De manera similar, el empleo de polisacáridos capsulares combinados con leucotoxina tampoco ha generado protección; sin embargo, el sobrenadante de cultivos mezclados con leucotoxina recombinante ha sido efectivo en ensayos con animales desafiados, lo que sugiere que la mejor opción como vacuna para la Mannheimiosis Bovina sea la mezcla de leucotoxina asociada con antígenos de sobrenadante (Highlander, 2001).

También se ha informado sobre algunos resultados exitosos mediante el uso de vacunas vivas. Sin embargo, existe la preocupación respecto a la posible virulencia de estas cepas (Panciera *et al.*, 1984). Estudios recientes se han enfocado a lograr la inducción de inmunidad local contra *M. haemolytica* en bovinos, mediante la liberación de antígenos a través de la mucosa, reduciendo así la colonización de la nasofaringe por parte del microorganismo (Rice *et al.*, 2008), ya sea mediante la expresión de antígenos de *M. haemolytica* en vectores virales, que facilitarían la replicación en el tracto respiratorio superior, o la administración oral de dichos

antígenos encapsulados en microesferas de alginato (Rice *et al.*, 2008; Bowersock *et al.*, 1999) así como el desarrollo mediante ingeniería genética, de plantas para la expresión de antígenos de *M. haemolytica*, a fin de producir vacunas transgénicas comestibles (Lee *et al.*, 2001). Estos antígenos derivados de plantas fueron inmunogénicos cuando se inyectaron en conejos y también mediante vacunas orales estimularon una respuesta inmune en la mucosa de becerros (Lo Ry, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar y duración del estudio

El estudio se realizó en las puntas de alpaca de la estación experimental IVITA- Maranganí, CIICAS - La Raya, perteneciente a la Universidad Nacional de San Antonio de Abad del Cusco, y en las comunidades campesinas del distrito de Maranganí, Provincia de Canchis, departamento de Cusco. El trabajo se realizó en épocas de lluvia entre los meses de Enero a Marzo, ya que debido a las condiciones climáticas de estas épocas, hay mayor presentación de casos de neumonía en las crías de alpaca.

2. Tamaño de muestra

El tamaño de muestral se determinó de acuerdo al Teorema del límite central que establece un tamaño de muestra ≥ 30 animales para estudios descriptivos.

3. Animales

Se tomaron muestras de 30 crías de alpaca entre 0 y 30 días de edad muertas o enfermas con signos clínicos compatibles con neumonía durante Enero-Marzo 2009. Por lo general, los animales realizaban el pastoreo desde las 6:00 hasta las 17:00 horas, luego eran encerrados en su dormidero; el clima era frío con fuertes precipitaciones las cuales hacían que los corrales se llenen de barro afectando a todas las crías.

Los dormideros eran corrales que no contaban con techo, lo que hacía que los animales estuvieran expuestos a las precipitaciones. Una de las actividades que caracterizaba a los

pastores de cada punta de alpacas es el movimiento constante de los animales entre las estancias y la esquila se realiza en instalaciones comunales.

4. Muestras

Se tomaron muestras de pulmón provenientes de crías de alpacas entre 0 y 30 días. Diariamente se hacían visitas a las puntas de alpaca a fin de recolectar crías con muerte súbita luego de una noche muy fría o aquellas muertas con signos de enfermedad respiratoria como decaimiento, tos, respiración dificultosa, salivación excesiva y secreción por las fosas nasales.

Criterios de inclusión: Pulmones que mostraban lesiones neumónicas con neumonía intersticial y bronconeumonía, nódulos linfáticos mediastínicos agrandados, secreción mucosa en vías respiratorias, contenido de material purulento en pulmón o vías respiratorias, edema y/o congestión y adherencias pulmonares.

Criterios de exclusión: No se consideraron para el aislamiento aquellos pulmones que no presentaban lesiones macroscópicas o que presentaban lesiones compatibles con otros procesos.

5. Recolección de datos

Se tuvo una hoja de registro para cada animal donde se indicó la procedencia de la cría, edad expresada en días, raza o tipo, signos clínicos en caso de haberse observado alguno, modo de muerte, lesiones observadas en la necropsia y el seguimiento del aislamiento bacteriano.

6. Procesamiento de las muestras

Las crías muertas o gravemente enfermas fueron sometidas a necropsia en el laboratorio de la estación experimental más cercana, dentro de aproximadamente las 6 horas transcurridas como máximo. Luego de realizada la necropsia se tomaron muestras de tejido pulmonar con lesiones compatibles con neumonía. La remisión de muestras fue tomada con guantes de látex y en bolsas estériles para el examen bacteriológico. Cuando el lugar de la necropsia no fue cercano al laboratorio, las muestras fueron remitidas en condiciones de refrigeración (2-4°C).

6.1. Materiales

6.1.1. Materiales para el muestreo. Bandeja, Cuchillos, Tijeras, Bolsas plásticas, Plumón indeleble, Caja de tecnopor, Pabilo, Frascos pequeños, Refrigerantes, Medios de transporte.

6.1.2. Equipo y Material de Laboratorio. Balanza, Estufa, Autoclave, Microscopio, Mechero, Agar Muller-Hinton, Agar Mc Conkey, Caldos de cultivos, Sangre de alpaca, Placas Petri de

vidrio: grandes y pequeñas, Matraces, Probeta, Tubos de Ensayo, Espátula, Tijeras, Pinzas, Guantes, Laminas portaobjeto, colorantes, Aceite de inmersión.

6.2. Procesamiento

Para el análisis de las muestras remitidas se empleó la técnica de cultivo e identificación bacteriana para bacterias de la familia Pasteurallaceae, según el protocolo de Aislamiento e Identificación de bacterias del Laboratorio de Bacteriología Veterinaria.

- a. Los pulmones se colocaron en una bandeja. Para su cultivo, se procedió a quemar la superficie de la porción del pulmón a analizar con una espátula incandescente.
- b. Se cortó, con una hoja de bisturí estéril, una pequeña muestra de 1 cm x 1 cm hacia la parte central del órgano, exponiendo la superficie interna del parénquima pulmonar para realizar la impronta en el medio de cultivo.
- c. Se toma la muestra de pulmón con material estéril, luego se realizó una impronta sobre la superficie del medio de cultivo frotándolo y presionándolo ligeramente sobre la superficie en Agar Sangre y otra en Agar Mc Conkey.
- d. Con un asa de siembra se agotó la muestra por estrías en el medio de cultivo y se llevaron a la estufa, donde fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.
- e. Transcurridas las 24 horas de incubación de las placas se observó la características de la colonias en caso éstas hubieran crecido se describió el color, olor, forma y consistencia a fin de determinar la colonia aislada, en el caso de las placas que no mostraron crecimiento se volvieron a incubar a fin de observar algún crecimiento en las siguientes 24 horas, en caso no mostraron crecimiento después de 48 horas, se registraron como muestras sin crecimiento. Para facilitar el análisis y descarte de las colonias, en base a la morfología se calificaron tres tipos de colonias.

BNH (colonias blanquecinas no hemolíticas): colonias de color blanquecino, de aspecto mucoso, no hemolíticas compatibles con *Pasteurella multocida*. Se tomó una colonia por muestra con excepción de los pulmones donde se observaron alguna variación morfológica entre ellas.

TH (colonias traslúcidas hemolíticas): las colonias de aspecto translúcido, pequeñas y que produjeron hemólisis en agar sangre compatible con bacterias del complejo *Mannheimia-Biberstenia*.

T (otras colonias): Colonias que podían ser traslucidas no hemolíticas fueron clasificados como miembro de la familia Pasteurellaceae.

- f. Se tomaron las colonias sospechosas y se realizó tinción Gram a cada una de las colonias. Se llevaron a microscopio a aumento de 100x y aceite de inmersión, para determinar la morfología bacteriana y comprobar que fueran Gram negativas.
- g. Luego de determinarse la morfología bacteriana se marcaron las colonias sospechosas y se realizó la prueba de la oxidasa.
- h. Se realizaron las pruebas bioquímicas para identificar las especies del género a todas las colonias oxidasa positiva y bacilos gram negativos.
- i. Las bacterias que cumplieron con las características bioquímicas fueron consideradas como especie de la familia Pasteurellaceae, de acuerdo al cuadro detallado a continuación.

Cuadro 5. Caracterización Bioquímica de las especies bacterianas de la familia Pasteurellaceae.

Características Diferenciales	<i>Mannheimia Haemolytica</i>	<i>Pasteurella Multocida</i>	<i>Biberstenia Trehalosi</i>	<i>Mannheimia Glucosida</i>
Crecimiento en Agar Mc Conkey	+	-	+	v
Hemólisis en agar sangre	+a	-	+	w
Producción de indol	-	+	-	-
Actividad Catalasa	+	+	-	+
Actividad Ornitina descarboxilasa	-	+	-	+
Fermentación Manitol	+	+	-	+
Fermentación D-sorbitol	+*	+*	-	+
Oxidasa	+	+	+	+
Movilidad	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	+

V.Variable. *Con algunas excepciones. W. Positivo débil. (+)Positivo dentro de 14 días de incubación.

a. Babour *et al.* 1997 describe que algunas cepas en el tercer subcultivo pierden la capacidad de producir hemólisis.

Las bacterias fueron identificadas por sus características metabólicas tales como hemólisis, crecimiento en agar Mc Conkey, oxidasa, movilidad, producción de indol, ornitina descarboxilasa, fermentación de manitol, fermentación de sorbitol e hidrólisis de Esculina.

7. Análisis estadístico

La frecuencia en la presentación bacteriana, se determinó por un porcentaje simple. Con el número de veces que se aisló el agente sobre el total de muestras positivas, comparando con la presentación de éstos en otras especies. Para ello se utilizó el software de distribución gratuita Epi InfoTM versión 3.5 (Mayo, 2008) del centro de control de Enfermedades y Prevención – CDC (por sus siglas en inglés Center for Disease Control and Prevention), Estados Unidos.

$$P = \frac{\# \text{ Cepas por } sp.}{n} \times 100$$

P = Prop. Obtenida %

n = Número de muestras

IV. RESULTADOS

1. Población afectada

Se analizaron un total de 30 crías de alpacas entre 0 y 30 días de edad con signos clínicos compatibles con problemas respiratorios. Los animales fueron agrupados por edades en cuatro semanas, aunque, en algunos casos no fue posible determinar la edad exacta de las crías. El detalle se muestra a continuación en el cuadro 6.

Cuadro 6. Detalle de la frecuencia de edades en la cual la cría de alpaca murió o estuvo gravemente enferma por una infección compatible con neumonía.

Edad	Número	Porcentaje	Límite de confiabilidad (95%)	
Animales sin datos de edad	5	16.7%	5.6%	34.7%
Crías de 1-7 días (1° semana)	1	3.3%	0.1%	17.2%
Crías de 8-14 días (2° semana)	1	3.3%	0.1%	17.2%
Crías de 15-21 días (3° semana)	15	50.0%	31.3%	68.7%
Crías de 22-30 días (4° semana)	8	26.7%	12.3%	45.9%
Total	30	100.0%		

Como se observa en el cuadro 6 no se determinó la edad de 5 crías. La mayor presentación de mortalidad se dio en animales con problemas respiratorios en la tercera semana con 50% (15/30) seguido por el 26.7% (8/30) que murió en la cuarta semana.

2. Signos respiratorios

Los signos más comunes encontrados se detallan en el cuadro 7, como se puede observar el 77% (22/30) de las crías fueron encontradas muertas al amanecer. En el grupo de las crías de tres y cuatro semanas de edad además de ser encontradas muertas, hubo un grupo que se encontró en estado grave mostrando decaimiento, secreción mucosa por las fosas nasales(17%),

disnea (10%), tos (10%) y salivación excesiva 6.7%. Sólo en el 3% (1/30) de los animales fue encontrado otro signo que no era respiratorio (como diarreas).

Cuadro 7. Resumen de los signos encontrados en las crías de alpaca en la etapa neonatal.

Clasificación de edades	Muerte	Decaimiento	Tos	Disnea	Secreción mucosa	Salivación excesiva	Otros (no respiratorios)	Total de animales por edad
Animales sin datos de edad	5 (22.7%)							5
1° semana	1 (4.5%)							1
2° semana	1 (4.5%)							1
3° semana	9 (40.9%)	6 (100%)	3 (100%)	1 (33.3%)	3 (60%)	1 (50%)	1 (100%)	15
4° semana	6 (27.2%)			2 (66.7%)	2 (40%)	1 (50%)		8
Total	22 (77%)	6 (20%)	3 (10%)	3 (10%)	5 (17%)	2 (6.7%)	1 (100%)	30

Pueden haberse presentado más de un signo por animal que se encontraba grave, con excepción de los animales muertos.

3. Hallazgos de necropsia

A la necropsia los animales analizados mostraron diferentes lesiones macroscópicas compatibles con neumonía como congestión, edema, consolidación de los lóbulos apicales, nódulos linfáticos mediastínicos agrandados, secreción mucosa en tráquea, adherencias pulmonares, petequias y presencia de material purulento en vías respiratorias y al corte del pulmón; todos descritos en el cuadro 8. En los animales en la tercera semana de edad se encontró que el 66.67%(8/15) presentaron focos neumónicos, 46.6%(7/15) presentaron congestión y edema, en 33.3% (5/15) de los casos se encontró consolidación de los lóbulos apicales, 20 % (3/15) de las muestras contenía material purulento, nódulos linfáticos agrandados y adherencias pulmonares; y en 6.6% (1/15) de los casos se encontró petequias y también secreción mucosa. En la cuarta semana de edad los hallazgos correspondieron a focos en 87.5% (7/8) de los casos, congestión y edema en 75% (6/8), también se encontró consolidación y nódulos linfáticos agrandados en 38% (3/8) de los pulmones examinados y se encontró pulmón con secreción mucosa en 12.5% (1/8) de las muestras examinadas.

Cuadro 8. Hallazgos de necropsia. Número de animales con lesiones encontradas en los pulmones examinados relacionados con el rango de edad.

Clasificación de edades	Consolidación de lóbulos apicales	Adherencia pulmonares	Congestión/edema	Focos neumónicos difusos	Material purulento en pulmón	Nódulos linfáticos mediastínicos agrandados	Petequias	Secreción mucosa en vías respiratorias	Total de animales por edad
Sin edad	1 (11%)		5 (28%)	2 (11%)		2 (25%)	1 (50%)	2 (50%)	5
1° semana				1 (5%)					1
2° semana				1 (5%)					1
3° semana	5 (56%)	3 (100%)	7 (39%)	8 (42%)	3 (100%)	3 (38%)	1 (50%)	1 (25%)	15
4° semana	3 (33%)		6 (33%)	7 (37%)		3 (38%)		1 (25%)	8
Total	9	3	18	19	3	8	2	4	30

Las lesiones detalladas se encontraron como únicas y en otros casos se encontraba más de una lesión por pulmón.

4. Clasificación macroscópica de las neumonías

Una vez realizada la necropsia, de acuerdo a las lesiones encontradas se clasificó a las neumonías macroscópicamente en tres tipos: bronconeumonía, neumonía intersticial y neumonía lobar de acuerdo a la literatura citada por MacGavin y Zachary en 2007 (Cuadro 9). En 66% (17/30) de los pulmones evaluados las lesiones eran compatibles con bronconeumonía supurativa, el 10% (3/30) bronconeumonía fibrinosa (neumonía lobar) y el 27% (8/30) correspondía a neumonía intersticial. En 7% (2/30) de los casos no se obtuvo información suficiente para clasificarla. Cabe resaltar que el 59% (10/17) de los casos corresponden a bronconeumonías en crías de la tercer semana de edad.

Cuadro 9. Clasificación macroscópica de las neumonías en las crías de alpaca con signos compatibles con neumonía por bacterias de la familia Pasteurellaceae.

Clasificación de edades	Sin datos disponibles	Bronconeumonía supurativa	Neumonía intersticial	Bronconeumonía fibrinosa (N lobar)	Total por edad
Sin edad		3 (18%)	1 (13%)	1 (33.3%)	5
1° semana			1 (13%)		1
2° semana		1 (6%)			1
3° semana	1 (50%)	10 (59%)	3 (38%)	1 (33.3%)	15
4° semana	1 (50%)	3 (18%)	3 (38%)	1 (33.3%)	8
Total por neumonía	2 (100%)	17 (100%)	8 (100%)	3 (100%)	30 (100%)

5. Aislamiento de colonias

De las 30 muestras de pulmones compatibles con signos de neumonía, la siembra en medios de cultivo reveló que un 86.7% (26/30) de los pulmones fue positivo al crecimiento de bacterias sospechosas de pertenecer a la familia Pasteurellaceae en función a sus características de crecimiento, la tinción gram y la prueba de oxidasa. Las colonias fueron clasificadas en tres tipos según su morfología: TH, BNH y T. En total se seleccionaron 45 colonias pertenecientes a la familia Pasteurallaceae de un total de 26 pulmones como detalla el cuadro 10.

Cuadro 10. Determinación del tipo de colonias pertenecientes a la familia Pasteurallaceae pertenecientes a crías de alpacas clasificadas en función a las características de crecimiento.

Tipo de colonias*	Número de col. aisladas		N° de pulmones de los que procedían según n° de colonias		
	N°	%	1 col.	2 col.	≥ 3 col.
BNH (posible <i>P. Multocida</i>)	24	53.3%	9	7	9
T (otras Pasteurellaceae)	4	8.9%	1		1
TH (posible <i>Mannheimia-Biberstenia</i>)	17	37.8%	4	7	7
Total	45	100.0%			

*Todas las colonias fueron bacilos o cocobacilos gram negativos, oxidasa positivos.

a. Pruebas bioquímicas

A fin de determinar las especies bacterianas aisladas pertenecientes a la familia Pasteurellaceae, se realizaron pruebas bioquímicas a las 45 colonias oxidasa +, sospechosas de pertenecer a la familia Pasteurallaceae. El cuadro 11 muestra en detalle el tipo de especie aislada y el tipo de colonia a la cual pertenecía según la clasificación anterior. De los 45 aislados el 100% (24/24) de colonias BNH pertenecía a la especie *Pasteurella multocida*, el 100% (4/4) de colonias T fueron clasificadas como *Mannheimia sp.* y el 100% (17/17) fueron alguna especie del género *Mannheimia*: (4) *M. glucosida* y (13) *M. haemolytica*.

Cuadro 11. Resultados de la identificación mediante pruebas bioquímicas de los aislados oxidasa positivos.

Clasificación de colonias	<i>M. glucosida</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia sp.</i>	<i>P. multocida</i>	TOTAL
BNH				24	24
T			4		4
TH	4	13			17
TOTAL	4	13	4	24	45

El resumen de las características bioquímicas de los 45 aislados de bacterias pertenecientes a la familia Pasteurellaceae y las características bioquímicas según los patrones se muestran en el cuadro 12. En algunos casos se obtuvieron respuestas variables en las reacciones bioquímicas en las cepas de campo. Los resultados de *P. multocida* muestran 25% (6/24) de variabilidad a la prueba de sorbitol.

Cuadro 12. Resumen de las características bioquímicas de los aislados identificados como parte de la familia Pasteurellaceae^a.

Características bioquímicas	<i>P. multocida</i>		<i>M. haemolytica</i>		<i>M. glucosida</i>		<i>Mannhemia sp.</i>
	Campo (24)	Caract. básicas	Campo (13)	Caract. básicas	Campo (4)	Caract. básicas	Campo (4)
Crec. Mc Conkey	-	-	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	-	-	+	+	V[2]
Sorbitol	V[6]	+	-	-	+	+	V[1]
Ornitina	+	+	-	-	+	+	V[1]
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	-	-	-	-	V[2]
Esculina	-	-	-	-	+	+	-
Hemólisis	-	-	+	+	+	+	V[2]

^a. Todos los aislados fueron cocobacilos gram negativos, oxidasa positivos. V.Variable. Números en paréntesis indica el número de cepas evaluadas. Números en corchetes son las cepas negativas a la prueba.

6. Especies aisladas

Las especies bacterianas aisladas fueron *Pasteurella multocida* en 60% (18/30) de las muestras, *Mannheimia haemolytica* en 37% (11/30), *Mannheimia sp.* en 13% (4/30) y *Mannheimia glucosida* en 10% (3/30) de los casos; el 13% (4/30) de las muestras no mostró desarrollo de bacterias perteneciente a la familia Pasteurellaceae, como muestra el cuadro 13. Además en algunos casos se observó la coexistencia de dos o más bacterias de la familia Pasteurellaceae en una misma muestra (cuadro 14). Resaltando la coexistencia entre *P. multocida* y *M. haemolytica* en el 10% (3/30) de los pulmones y en el 7% (2/30) se demostró coexistencia entre *P. multocida* y *M. glucosida*. Solo en una muestra se encontró la coexistencia de tres especies bacterianas 3% (1/30) estas fueron *P. multocida*, *M. haemolytica* y *Mannheimia sp.*

Cuadro 13. Resultado de especies aisladas de los 30 pulmones de crías de alpaca por signos de neumonía.

Especie aislada	Sin edad	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° semana	Total
Sin desarrollo				2	2	4 (13%)
<i>P. multocida</i>	3			10	5	18 (60%)
<i>M. haemolytica</i>	3		1	4	3	11 (37%)
<i>Mannheimia sp.</i>	2	1	1			4 (13%)
<i>M. glucosida</i>	1			2		3 (10%)
Total de crías por edad	5	1	1	15	8	30 (100%)

Cuadro 14. Resultado de las especies aisladas en las 30 crías compatibles con neumonía.

Especie(s) aislada(s)	Sin edad	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana	Total
<i>P. multocida</i> + <i>M. haemolytica</i>				1	2	3 (10%)
<i>P. multocida</i> + <i>M. glucosida</i>				2		2 (7%)
<i>M. haemolytica</i> + <i>M. glucosida</i>		1				1 (3%)
<i>P. multocida</i> + <i>Mannheimia sp.</i>		1				1 (3%)
<i>M. haemolytica</i> + <i>Mannheimia sp.</i>			1			1 (3%)
<i>P. multocida</i> + <i>M. haemolytica</i> + <i>Mannheimia sp.</i>		1				1 (3%)
Total de crías por edad	5	1	1	15	8	30 (100%)

De acuerdo a las edades de las crías, los resultados mostrados en el cuadro 13 resaltan que en el 47% (7/15) de las crías en la tercera semana y el 38% (3/8) de las crías de 4 semanas las neumonías fueron causadas por *P. multocida*. El 20% (3/15) de las crías de 3 semanas presentaron neumonía por *Mannheimia haemolytica*.

Haciendo un análisis a las bacterias encontradas y el tipo de neumonía causada, se incluye el cuadro 15 que detalla la relación entre las especies bacterias más aisladas y el tipo de neumonía que causa en las muestras de pulmones obtenidas. *P. multocida*, el agente encontrado en mayor frecuencia asocia su presentación a cuadros de bronconeumonía en el 61.1% (11/18) de los casos, *Mannheimia haemolytica* en 54.5% (6/11) de sus presentaciones cursa también con bronconeumonía.

Cuadro 15. Relación del tipo de neumonía causada con las especies bacterianas de mayor presentación

Espece aislada	Sin datos	Bronconeumonía supurativa	Neumonía intersticial	Bronconeumonía fibrinosa (N. lobar)	Total
<i>P. multocida</i>	1 (5.6%)	11 (61.1%)	3 (16.7%)	3 (16.7%)	18 (100%)
<i>M. haemolytica</i>	1 (9.1%)	6 (54.5%)	3 (27.3%)	1 (9.1%)	11 (100%)
Colonias mixtas	1 (11.1%)	3 (33.3%)	2 (22.2%)	3 (33.3%)	9 (100%)

Los datos presentados no incluyen las presentaciones bacterianas con mayor detalle puesto que los datos analizados no muestran diferencia estadísticamente significativa.

V. DISCUSIÓN

La neumonía es una afección respiratoria (Bustinza, 2001; Ramírez, 1980), de curso rápido (Ramírez *et al.*, 1998) que se observa en neonatos y animales jóvenes (Huanca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998), especialmente en crías jóvenes (Bustinza, 2001), hasta el destete principalmente (Huanca, 1991). De acuerdo al estudio realizado se ratificó que la mortalidad en las crías de alpaca se da en los primeros 30 días de vida, sobre todo durante la tercera y cuarta semana de edad que fue donde se encontró el 50% y 26.7% respectivamente de la mortalidad. Esto se debe tal vez a la protección que la cría recibe de la madre por el calostro. Garmendia *et al.* en 1987 encontró asociación entre la presentación de procesos neumónicos y niveles bajos (9-15 mg/ml) de IgG en crías menores de 21 días que es la etapa en las que permanece esta protección, posteriormente la concentración de IgG baja y si la cría no ha desarrollado aún sus propias defensas estaría predispuesta a los procesos neumónicos. Motivo por el cual probablemente no se obtuvo mayor porcentaje de animales con neumonía en crías de la primera y segunda semana, conforme la cría llegaba a la tercera semana los anticuerpos calostrales disminuían su concentración de IgG por lo cual se hacían más propensas a sufrir de neumonía.

En cuanto a los signos respiratorios observados el 76.6% de las crías fueron encontradas muertas luego de una noche lluviosa o de fuerte helada. Pizarro (1999) menciona que en animales menores de tres semanas la presentación generalmente es aguda, el curso que sigue la enfermedad es muy rápido, por ello amanecen muertas lo cual efectivamente tiene relación con el presente estudio en el cual podemos afirmar que las crías tuvieron un proceso agudo. En las crías que aún se encontraban vivas se observaron signos como decaimiento, tos, disnea, secreción mucosa por las fosas nasales y por la boca, tal como lo mencionan Ramírez *et al.*, 1980 y 1991.

En los hallazgos de necropsia Ameghino *et al.* (1991) menciona lesiones en los ganglios linfáticos incluso pleuritis con adherencia fibrinosa y bronconeumonía, y Ramírez *et al.* (1998)

menciona también encontrar los pulmones congestionados, focos neumónicos en la región craneoventral y exudado en tráquea. Lo que se corrobora en este estudio donde todos los animales mostraron congestión, edema y focos neumónicos y las lesiones mencionadas por estos autores.

MacGavin y Zachary (2007) clasifica las neumonías en cuatro tipos: bronconeumonía (supurativa y fibrinosa), neumonía intersticial, neumonía granulomatosa y neumonía embólica. El 57% de las lesiones encontradas en las muestras fueron compatibles con bronconeumonía supurativa tal como la lesión que menciona Ramírez *et al.* (1998) y López (2001) la considera como una lesión típica de la *Pasteurella multocida*. Sin embargo también fueron encontradas lesiones compatibles con neumonía intersticial y bronconeumonía fibrinosa (neumonía lobar). El lóbulo afectado frecuentemente fue el lóbulo apical, la predilección por el lóbulo apical ya ha sido reportado por otros autores (Haziroglu *et al.*, 1996; Oruc, 2006; Sheehan *et al.*, 2007).

En lo que respecta al aislamiento bacteriano, en rumiantes, especialmente bovinos, se ha llegado aislar bacterias hasta en el 52% de las muestras de pulmones obtenidas, de las cuales el 83% de las bacterias aisladas fueron identificadas como Pasteurellaceae (Angen *et al.*, 2009), un porcentaje similar (86.7%) de las bacterias aisladas en el estudio pertenecieron a especies de la familia Pasteurellaceae. Según Ackermann y Brogden, 2000, en casos de animales con signos de neumonía, tanto ovinos como en bovinos, *M. haemolytica* y *P. multocida* se consideran como principales patógenos bacterianos involucrados en procesos respiratorios. Efectivamente los resultados obtenidos en crías de alpaca con signo de neumonía del presente estudio, demuestran que las especies aisladas más frecuentes fueron *P. multocida* y *M. haemolytica*, siendo *P. multocida* la bacteria con mayor frecuencia hallada.

Martín (1996) menciona que se ha observado interacción entre diferentes bacterias causantes de neumonía en ovinos, que actúan de forma sinérgica agravando los casos. En nuestro estudio se ha observado la coexistencia de dos o más especies bacterianas de la familia Pasteurellaceae en 29% (9/30) de las muestras analizadas, para poder determinar mejor la interacción que se da entre ellas sería necesario profundizar el estudio.

Se han identificado bacterias asociadas a cuadros neumónicos agudos, estos géneros bacterianos aislados varían con el área geográfica de crianza (Ramírez *et al.*, 1998). Sin embargo no parece ser tan determinante, en el presente estudio se pudo aislar *P. multocida* en 53% de las muestras y *M. haemolytica* en 29%, inclusive se ha encontrado coexistencia de dos o más especies bacterianas en las muestras analizadas, lo que sí se puede afirmar es que *P. multocida* tuvo mayor frecuencia como causante de los procesos neumónicos, tal como lo indican Ameghino y Calle (1989), en donde mencionan que los aislamientos bacterianos que

realizaron revelaron que *P. multocida* se presenta con mayor frecuencia que *Mannheimia haemolytica*, estando presente en 11 crías de 26 de su estudio.

Biberstein & Gills (1962) indican que aislaron *Mannheimia glucosida* como microflora del tracto respiratorio superior, Quirie *et al.* (1986) señalaron su aislamiento en ovejas y algunos casos reportados en terneros. Jaramillo-Arango *et al.* (2009) logran aislar esta bacteria en algunos casos con neumonías u otras enfermedades. En nuestro estudio en crías de alpaca se ha logrado aislar *Mannheimia glucosida* en coexistencia con otras bacterias en 7% de los casos, se ha aislado junto a *P. multocida* y en el 3% junto a *M. haemolytica*; en ninguno de los casos se ha logrado aislar como único agente causante de neumonía.

En cuanto a las pruebas bioquímicas realizadas se ha encontrado variabilidad en el caso de los aislamientos de *P. multocida* en la prueba de sorbitol, esto puede deberse a la clasificación en subespecies de *Pasteurella multocida*, la que se clasifica en 3 subespecies: *multocida*, *septica* y *gallicida* de acuerdo a su habilidad para fermentar sorbitol y dulcitol, clasificándose como *P. multocida* subesp. *multocida* los aislados sorbitol positivo y como *P. multocida* subesp. *septica* los aislados sorbitol negativo. En la actualidad existen estudios donde se evidencia que las características fenotípicas de *P. multocida* también pueden ser variables, como sucede en otros miembros de la familia Pasteurellaceae. Variaciones para las pruebas de manitol, ODC, sorbitol y sucrosa se han observado en otros estudios (Christensen *et al.*, 2003). Uno de los métodos para determinar la subespecie se basa en las bioquímicas en base a la fermentación de sorbitol y dulcitol, sin embargo estos resultados no siempre corresponden con las pruebas genéticas (Kuhnert *et al.*, 2000; Davies, 2004).

Al lograr identificar las *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Mannheimia glucosida* en crías de alpaca enfermas se demuestra la presencia de estas especies bacterianas pertenecientes a la familia Pasteurallaceae en los procesos neumónicos de la crías de alpaca, se sugerirían mayores estudios y pruebas genéticas para determinar todos los agentes implicados pertenecientes a esta familia.

VI. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio el mayor porcentaje de mortalidad en crías de alpaca debido a procesos respiratorios se dio en la tercera semana, seguida por la cuarta semana de edad.
2. Se ha demostrado el aislamiento de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Mannheimia glucosida* en crías de alpaca afectadas con neumonía aguda de acuerdo al estudio realizado.
3. Se ha determinado coexistencia en una misma muestra de *P. multocida* y *M. haemolytica* y *P. multocida* y *M. glucosida* principalmente.
4. No se ha logrado aislar *M. glucosida* como único agente causal de neumonías.

VII. RECOMENDACIONES

1. Debido a las constantes reclasificaciones que han sufrido los miembros de la familia Pasteurellaceae se recomienda, hacer un estudio utilizando pruebas genéticas a fin de determinar todas las especies y subespecies bacterianas de la familia presentes en las neumonías.
2. Las pruebas genéticas por ser más específicas también determinarán si hay más de una especie bacteriana en una misma muestra y así ver si hay interacción entre éstas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adlam, C. 1989. The structure, function and properties of cellular and extracellular components of *Pasteurella haemolytica*. In *Pasteurella and Pasteurellosis*. Edited by C. F. Adlam & J. M. Rutter. London: Academic Press. Londres. pp. 75-92.
2. Aguilar, T. y Tórtora, P. 1989. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. Memorias del III Congreso Nacional de Producción Ovina, Tlaxcala, Tlaxcala, México. Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos, México, D.F. pp. 146-149.
3. Aley, M.R. and Clarke, J.L. 1977. The influence of microorganisms on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. *N. Z. Vet. J.* 25: 20.
4. Allen Jw, Viel L, Bateman Kg, Rosendal S, Shewen Pe, Physick-Sheard P. 1991. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can J Vet Res* 1991; 55:341-346.
5. Ameghino, E. 1986. Mortalidad perinatal en Alpacas. Curso sobre sistemas de producción alpaquera del Departamento de Puno. Fac. Med. Vet. Y Zoot. UNA – IIDSa. Puno, Perú. Libro Resum. P 147-158.
6. Ameghino, E. 1987. Mortalidad en crías de alpacas y enfermedades infecciosas. II Curso sobre crianza de Camélidos Sudamericanos domésticos: Alpacas y Llamas. Organiz. Por INIIA. Prog. Nac. Ganadería-Sub programa Camélidos. Lima, Perú.
7. Ameghino, E. 1988. Mortalidad neonatal en Alpacas. VII Convención Internacional de Espec. En Camélidos Sudamericanos. Oruro, Bolivia.

8. Ameghino, E. 1988a. Mortalidad en crías de Alpacas. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú. Libro Res. p77.
9. Ameghino, E. 1988b. Algunos aspectos sobre la mortalidad perinatal en alpacas. Curso Post Congreso (Panamericano) de Camélidos Sudamericanos Domésticos. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú.
10. Ameghino, E. 1991. Causas de Mortalidad en crías de Alpaca en Producción de Rumiantes Menores: Alpacas. Edit. César Novoa y Arturo Flórez. Perú.
11. Ameghino, E. y Calle, S. 1989. Aislamiento de *Pasteurella multocida* de Procesos Neumónicos de crías de Alpacas. XII Reunión Científica Anual. Asociación Peruana de Producción Animal. Lima, Perú. Memo 1989 p.99 (Abs.).
12. Ameghino, E. y Martini J. 1991. Mortalidad en crías de alpacas. IVITA. Lima, Perú.
13. Angen, O., Aalbaek, B., Falsen, E., Olsen, J. E. & Bisgaard, M. 1997. Phenotypical relationship among strains classified with the ruminant [*Pasteurella*] *haemolytica*-complex using quantitative valuation of phenotypic data. *Zentbl Bakteriol.* 285,459-479.
14. Angen, Ø.; Mutters, R.; Caugant, D.; Olsen, J.; Bisgaard, M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 49:67-86.
15. Apley, M. 2006. Bovine Respiratory Disease: Pathogenesis, Clinical Signs, and Treatment in Lightweight Calves. *Vet. Clin. Of North America: Food Animal Practice*, 22:399-411.
16. Barsallo, J.; Villena, C y Chavera, A. 1984. Abscesos en alpacas. VI Congreso Peruano Microbiol. Parasitol. Cusco, Perú. Resumen 113p. 53 (Abst.).
17. Barsallo, J. 1985. Agentes Bacterianos encontrados en el Aparato Respiratorio de Alpacas Aparentemente Normales. *Anales V Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos.* Cusco, Perú. 36p.

18. Biberstein, E. 1978. Biotyping and Serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Bergan, T. and Norris, J. Methods in Microbiology. New York. Academic Press. USA. Inc. 10: 253.
19. Biberstein, E, Gills, M., Knight, H. 1960. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet. 50:283- 300.
20. Biberstein, E. L. y Gills, M. G. 1962. The relationship of the antigenic types of the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. J. Comp. Pathol. 72:316-320.
21. Binkharst, G.; Henricks, P.A.; Ingh, S.; Hajer, R. and Nijkamp, F.; 1990. The effect of stress on host defense system on lung damage in calves experimentally infected with *Pasteurella haemolytica* type A1. J. Vet. Med. Ass. 37: 525-536.
22. Bisgaard, M. & Mutters, R. 1986. Reinvestigations of selected bovine and ovine strains previously classified as *Pasteurella haemolytica* and description of some new taxa within the *Pasteurella haemolytica*-complex. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B 94, 185-193.
23. Blackall, P. J., Angen, Ø.; Fegan, N., Blackall, L. L., Mutters, R. & Bisgaard, M. 2001. Characterisation of a novel Mannheimia sp from Australian feedlot cattle. Aust. Vet J. 79, 634–639.
24. Blackall, P.; Bojensen, A.; Christensen, H.; Bisgaard, M. 2007. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiology. 57:666-674.
25. Blood, D.; Henderson, J. y Radostist, O. 1988. Medicina Veterinaria. 6ta Ed. Nueva Edit. Interamericana. México. Pag. 94-117.
26. Boyce J, Lo R, Wilkie I, Adler B. 2004. *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: Giles CI, Prescott Jf, Songer Jg, Thoen Co, editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Carlton, Australia: Blackwell Publishing. pp. 273-294.
27. Bowersock TL, Hogenesch H, Suckow M, Guimond P, Martin S, Borie D *et al.* 1999. Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. Vaccine 17:1804-1811.

28. Bowland SI, Shewen Pe. 2000. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* ; 41:33-48.
29. Brogden, K.; Packer, R. 1979. Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am. J. Vet. Res.* 40:1332-5.
30. Bustinza, A. V. 2001. La Alpaca: Conocimiento del Gran Potencial Andino. Libro 1. Edit. Univ. Nac. Del Altiplano, Puno, Perú.
31. Bustinza M., J. A. 2000. Enfermedades de Alpacas. 2da. Ed. Lima, Perú.
32. Bustinza, V.; Burttening, P & Blackwell, R. 1988. Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). *J. Anim. Sci.* 66:1139 – 1143.
33. Calsín, E. 2008. Identificación de agentes virales y bacterianos causantes de neumonías agudas en crías de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 48-69p.
34. Carter, G. 1985. Bacteriología y Micología Veterinaria. Aspectos esenciales. Ed. El manual Moderno. México, D. F.
35. Chaslus-Dancla E, Lesage-Decauses Mc, Leroy-Setrin S, Martel JI, Coudert P, Lafont Jp. 1996. Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. *Vet Microbiol*; 52:91-102.
36. Christensen H, Bisgaard M, Bojesen A.M, Mutters R y Olsen J. 2003. Genetics relationship among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov. comb. Nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int. J Syst Evol Microbiol* 53, 275-287.
37. Davies, R. L. & Quirie, M. 1996. Intra-specific diversity within *Pasteurella trehalosi* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology* 142, 551–560.

38. Davies R. 2004. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S RNA gene. *Microbiology* 150, 4199-4210.
39. Derosa Dc, Mechor Gd, Staats Jj, Chengappa Mm, Shryock Tr. 2000. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin Microbiol* 2000; 38:327-332.
40. Euzéby, J. 2007. List of Prokaryotic name with standing in nomenclature- Family *Pasteurellaceae*. Francia.
41. FAO. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Junio 2005. 63 pp.
42. Félix, M.; Tallon, P.; Salavert, M.; Navarro, V.; Breton, J.; Perez-Belles, C. et al. 2003. Bacteriemia por *Pasteurella* spp.: una entidad infrecuente durante los últimos 8 años en nuestro centro. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Madrid, España*. 21: 334-9.
43. Fernández Baca, S. 1971. La Alpaca: reproducción y crianza. IVITA- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Bol. Div. 7: 7- 38. Lima- Perú.
44. Fernández Baca, S. 1991. Avances y Perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. ONU - FAO- Oficina Regional de Producción Animal. Santiago, Chile.
45. Fodor L, Varga J. 1988. Characterization of a new serotype of *P. haemolytica* isolated in Hungary. *Res. Vet. Sci.* 44:399.
46. Frank, G.H. and Wessman, G.E. 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 7: 142-145
47. Frank, G. H. 1989. Pasteurellosis of cattle. In *Pasteurella and Pasteurellosis*. Edited by C. Adlam & J. M. Rutter. London: Academic Press. pp. 197-222.
48. Fraser J., Donachie W, Quierie M y Gilmour N J. 1983. Rapid indirect hemagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J CLin Microbiol* 18. pp. 206-207.

49. Frederiksen, W. 1973. *Pasteurella* taxonomy and nomenclature. *Contrib. Microbiol. Immun.* 2: 170-176.
50. Garmendia, A. y Mc Guire, T. 1987. Mechanism and isotypes involved in passive immunoglobulin transfer to newborn alpaca (*Lama pacos*). *Am. J. Vet. Res.* 48 (10):1465-1471.
51. Garmendia, A.; Mc Guire, T. y Aedo, R. 1990. Procesamiento con Sulfito de Sodio. Método rápido para evaluar la transferencia pasiva de Ig calostrales a las crías de alpacas. En: Ameghino. Avances sobre la investigación en Salud Animal – Camélidos Sudamericanos. Bol. Div. N° 23 del IVITA. Lima, Perú. p. 53-77.
52. Gilmour NJ. 1978. Pasteurellosis in sheep. *Vet. Rec.* pp. 100-102.
53. Gilmour, N. 1.L. & Gilmour, J. 1989. Pasteurellosis of sheep. In *Pasteurella and Pasteurellosis*. Edited by C. Adlam & J. M. Rutter. London: Academic Press. pp. 223-262.
54. Hazirolu R, Diker K, Turkarslan J, Gulbahar M. 1996. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella multocida* antigens by immunoperoxidase technique in pneumonic ovine lungs.
55. Highlander S. 2001. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci.* 6:1128-1150.
56. Highlander, K.; Fedorova N.; Dusek, D.; Panciera, R.; Alvarez, L.; Rinehart, C. 2000. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun.* 68:3916-3922.
57. Heddleston, K.; Gallagher, J.; Rebers, P. 1972. Fowl cholera; gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* 16: 925-36.
58. Hoffman, E. 2002. The Complete Alpaca Book. Bonny Donn Press. Santa Cruz. California. USA.
59. Huanca, T. 1991. Manual de Sanidad en la crianza de Alpacas. Proyecto Alpacas INIAA – CORPUNO – COTESUIIC. Puno, Perú.

60. Huanca T, Apaza N y Gonzales M. 2007. Experiencia del INIA en el fortalecimiento del banco de germoplasma de camélidos domésticos. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15: 186-194 (Supl. 1)
61. Huanca, T.; Cárdenas, O.; Gonzales, M; Apaza N.; Sapana R.; Cabrera, Marco; Requena, Magno. 2011. INIA presentó primicia tecnológica mundial: Transferencia interespecífica de embriones en camélidos. En. AgroInnova. Año 2. Ed. 7. Marzo 2011
62. Hung, A; López, T; Perales, R y Noé, N. 1988. Micoplasmosis en Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú. (Abst.).
63. Infantas, J.C. 1977. Análisis de la situación de crianza de alpacas en el Perú. I Conversatorio multisectorial sobre desarrollo en Camélidos. Puno- Perú.
64. INFO-INIEA. Boletín del Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 2006. Boletín N° 002-06. Población y Producción en Proyecto camélidos.
65. INIA. Manejo en Crianza de Alpacas en Curso Regional. Agosto. 2008
66. IPACPERU - Instituto Peruano de la Alpaca y Camélidos. Crianza de Alpaca en Información Técnica – Proceso de la Fibra. Arequipa. 2010.
67. IVITA. 1972. Investigaciones del IVITA en CSA. Bol. Div. N° 110. 1972. Pag 5.
68. IVITA. 1998. Centro de Investigaciones Tropicales y de Altura. Marzo 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en camélidos sudamericanos. Unidad de Publicaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria. UNMSM. Pub. Tec. FMVN° 34. Lima – Perú. 18 – 20.
69. Jaramillo-Arango, c.; Trigo Tavera, f.; Suárez-Güemes, f. 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. Fac. Med. Vet. Zoot.. Univ. Nac. Autónoma de México. México, D.F., México.
70. Jaworski Md, Hunter Dl, Ward Ac. 1998. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J. Vet. Diagn. Invest. 10:49-55.

71. Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M. 2007. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet J 2007; 178:146-148.
72. Kehrenberg C, Salmon S, Watts J, Schwarz S. 2001. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the tet(H) plasmid pMHT1. J antimicrob chemother 48, 31-640.
73. Kimberling, C. 1988. Jensen and Swift's. Diseases of Sheep. 3rd. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. P.66, 110-111, 120-122, 216-221.
74. Koneman, E.; Stephen, D.; Williams, M.; Schrenberger, P.; Washington, C. 1999. Diagnóstico Micro Med biológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 388-461.
75. Kuhnert P, Boerlin P, Emler S, Krawinkler M, Frey J. 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *Septica* by 16S RNA gene sequencing. Int J Microbiol. 290, 599-604.
76. Lee Rw, Strommer J, Hodgins D, Shewen Pe, Niu Y, Lo Ry. 2001. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. Infect Immun 2001; 69:5786-5793.
77. Leotta, g.; vigo, g.; chinen, i.; prieto, m.; callejo r.; rivás, r. 2006. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. Revista Argentina de Microbiología. Argentina. 38: 125-129.
78. Lo Ry. 2001. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. Vet. Microbiol. 83:23-35.
79. Lo ry. 2008. Development of transgenic alfalfa expressing antigens of *Mannheimia hemolytica* as an oral vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis. Proceedings of the International Pasteurellaceae Society Conference 2008; 2008 Oct 12-15; Sorrento, Italia. Sorrento, Italia: International Pasteurellaceae Society, 2008: S:11.

80. Lopez A. 2001. Respiratory system, thoracic, cavity and pleura. En: Mc Gavin MD, Carlton, W Zachary, J. (Eds) Thomson's Special Veterinary Pathology. Mosby-Year book. Inc. pp.125-195.
81. Liu S-L, Schryvers A, Sanderson K, Johnston R. 1999. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. J Bacteriol 1999; 181:6747-6755.
82. Mac Gavin M.D., Zachary JF. 2007. Pathology Basis of Veterinary Disease. 4th edition. USA. Mosby ELSEVIER. 1476 p.
83. Martin W. 1996. Respiratory infections of sheep. Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 19 (3): 171-179.
84. Maslow j, Mulligan M. 1993. Molecular Epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis 1993:153-164.
85. Melo M. 1997. Sistemas de control y manejo sanitario en alpacas y llamas en la región del sur peruano. Ed 1. FMVZ-UNA. Puno-Peru. Rev. Inv. Vet. Perú. 2004; 15 (2): 127-131.
86. Merchant IA, Pecker AA. 1994. Bacteriología y Virología Veterinaria. España. Acribia. In: Whitt DD. Bacterial PATHOGENESIS. A molecular approach. USA: American society for Microbiology. 348 p.
87. Moro Sommo M. 1971. Enfermedades infecciosas de las alpacas. La alpaca, enfermedades infecciosas y parasitarias. IVITA. Bol. Div. 8: 7.
88. Murphy gl, Robinson lc, burrows ge. 1993. Restriction endonuclease analysis and ribotyping differentiate *Pasteurella haemolytica* serotype A1 isolates from cattle within a feedlot. J. Clin. Microbiol. 31:2303-2308.
89. Mutters, Bisgaard, Pohl. 1986. Taxonomic relationship of selected biogroups of *P. haemolytica* as revealed by DNA: DNA hybridation. Act. Pathol. Microbiol. B 94, 195-202.

90. Namioka, S.; Murata, M. 1961. Serological studies in *Pasteurella multocida*. II Characteristics of somatic (o) antigens of the organism. *Cornell Veterinarian*.51, 507-521.
91. Newsom, E. & Cross, F. 1932. Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J Am Vet Med Assoc* 80, 71 1-719.
92. Novoa, c. y Florez, A. 1991. Mortalidad Neonatal de crías Muertas por Causas Infecciosas en: Producción de Rumiantes Menores: Alpacas. Edit. César Moro – Arturo Florez. Perú.
93. Oruc E. 2006. The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30 593-599.
94. Oystein, A.; Quire, M.; Donachie, W.; and Bisgaard, M.1999. Investigacions on the species specificity of *Mannhemia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet. Microbiol.* 65: 283-290.
95. Panciera Rj, Corstvet Re, Confer Aw, Gresham Cn. Bovine pneumonic pasteurellosis: effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am J Vet Res* 1984; 45:2538-2542.
96. Pizarro, Ramón.1999. Sanidad animal. Enfermedades de los Camélidos Domésticos en Camelidotecnia. CONCYTEC. 1era Ed. Perú.
97. Pohl, S. 1979. *Reklassifizierung der Gattung Actinobacillus Brumpt 1910, Haemophilus Winslow et al. 1917 and Pasteurella Trevisan 1887 anhand phanotypischer und molekular Daten, insbesondere der DNS- Verwandtschaften bei DNA:DNA Hybridisierung in vitro und Vorschlag einer neuen Familie, Pasteurellaceae*. Thesis, Fachbereich Biologie der Philipps-Universitat Marburg /Lahn.
98. Purdy Cw, Straus Dc, Struck D, Foster Gs. 1993. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. *Am J Vet Res* 1993; 54:1637- 1647.
99. Quentin, N.; Russel, S. 1991. Bacteriología y micología médica. 2da Edición. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México D. F., México. P.426-427.
100. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, India: Blackwell Science. 137-142 p.

101. Quirie, M., Donachie, W. & Gilmour, N. 1986. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec* 119, 93-94.
102. Quispe, R.; Alfonso L.; Montes M.; Quicaño I. & Quispe E. 2009. Quality characteristics of Huacaya alpaca fiebre produced in the Peruvian Andean Plateau region of Huancavelica. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6(1): p.33-38.
103. Ramírez, A. 1980. Aspectos Sanitarios de la Alpaca. En: Curso Sistemas de Producción Pecuaria en los Altos Andes. Asociación Peruana de Producción Animal. Lima, Perú. P87-101.
104. Ramírez, A. 1991. Enfermedades Infecciosas en Alpacas y Llamas. Producción de Rumiantes menores: Alpacas. Perú. 201-247.
105. Ramírez, A. y Ellis, R. 1988. Nuevos concepto sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas. Instituto de investigaciones de Trópico y Altura (IVITA). UNMSM. Perú
106. Ramírez, A.; Franco, E. y García W. 1998. Diagnóstico y Control de enfermedades en Camélidos Sudamericanos. Estación Experimental Maranganí – La Raya. Cusco, Perú. Pub. Tec. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
107. Redes Sostenibles para la Seguridad Alimentaria-REDESA, 2006. Manual de Sanidad animal para el proveedor de asistencia técnica comunitario. USAID PERÚ. Lima, Perú. 60 pp.
108. Rice j, Carrasco-medina l, Hodgins d, Shewen p. 2008. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 2008; 8 117-128.
109. Rivera, H; Madawell, B. y Ameghino, E. 1990. Estudios Serológicos de Anticuerpos Virales en la Alpaca. En: E. Ameghino. Avances sobre Investigación en Salud de Camélidos Sudamericanos. Bol. Div. N°23 del IVITA. Unhiv. Nac. Mayor de San Marcos. Lima, Perú. P.32-40.
110. Rivera, H. y Mimbela, M. 1987. Serological Survey of Viral Antibodies in the Peruvian Alpaca (*Lama pacos*). *Am. J. Vet. Res.* 48 (2):189-191.

111. Rodríguez, H. y Mimbela, M. 1980. Microbiología de la secreción Nasal y Bucal en Alpacas. Resúmenes de Proyectos de Investigación, Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima, Perú. p.14 (Abst.).
112. Rosadio R., Ameghino E., Ramirez A. 1990. Diagnosis and control of diseases in sheep and alpaca in Peru. In: Improving Andean Sheep and Alpaca production. Mc Corkle CM (Ed). University of Missouri-Columbia Printing Services. Pp 141-220.
113. Rosadio R., Cirilo E., Manchego A., Rivera H. 2011. Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. Small Ruminant Res, doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.02.001.
114. San Martín. 1996. Nutrición en Alpacas y Llamas. Fondo contravalor Perú-Suiza. CISA/IVITA. Fac. Med. Vet. Univ. Nac.Mayor de San Marcos.Pub.Cient.IVITA. N° 27:28.
115. Sepúlveda H., Noemí. 2011. Manual para el Manejo de Camélidos Sudamericanos Domésticos. Fundación para la innovación Agraria. Ministerio de agricultura- Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 55pp.
116. Sharp, I. 1983.Acute Respiratory Virus Infections. En: W. Martin. Diseases of sheep. Edit. W. Blackwell. Sci. Publ. P.8-12.
117. Sheehan M, Cassidy J, Brady J, Ball H, Doherty M, Quinn P, Nicholas R, Markey B. 2007. An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland. Vet J 173, 630-637.
118. Smith, G. R. 1959. Isolation of two types of *Pasteurella haemolytica* from sheep. Nature 183, 1132–1133.
119. Sneath Ph, Stevens M. 1990. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 40:148-153.

120. Sutherland, A.D. and Donachie, W. 1986. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol. 11: 331-336
121. Tapia, E. y Málaga, J. 1989. Determinación macro-microscópica de las neumonías neonatales en alpacas (*Lama pacos*). Resúm. De Inevst. 1980-89. UNA-Fca. Med. Vet. Y Zoot. Puno. Perú. p15.
122. Trigo, F.J. 1998. Patología del Aparato Respiratorio. Patología Sistémica Veterinaria. 3ª ed. Ed. McGraw Hill, Interamericana. México, D.F., México. pp. 69.
123. Vadillo, S.; Píriz, S.; Mateos, E. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. España. 1era Edición. Madrid.
124. Vallejo T, Adriana. 2011. Avances y perspectivas del establecimiento del banco de germoplasma de camélidos. En Rev AgroInnova. Año 2. Ed. 7 Marzo 2011. P23.
125. Victorio W, Rosadio R, Rivera H y Manchego A. 2003. Evidencias serológicas de virus neumotrópicos en alpacas de la provincia de Canchis, Cusco. Rev. Inv. Vet. Perú. 2004; 15 (2) 127-131.
126. Villard L, Gauthier D, Lacheretz A, Abadie G, Game Y, Maurin F *et al.* 2006. Serological and molecular comparison of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* strains isolated from wild and domestic ruminants in the French Alps. Vet. J. 171:545-550.
127. Villarroel, J. 1991. Las Fibras. En: Avances y Perspectivas del conocimiento de los CSA. Edi. Fernández Baca. FAO. Santiago de Chile. 363-386.
128. Watts J, Yancey R, Salmon S, Case C. 1994. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. J Clin Microbiol. 32, 725-731.
129. Weber, D.; Wolfson, J.; Swartz, N.; Hooper, D. 1984. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. Baltimore. 63: 133-54.

130. Wilkie Bn, Markham Rj, Shewen Pe. 1980. Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. Am J Vet Res 1980; 41:1773-1778.
131. Yates WD. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis shipping fever pneumonia and viral bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can J. Med. 46: 225-263.
132. Younan M, Fodor L. 1995. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). Res. Vet. Sci. 58:98
133. Zavaleta R., Daniel. 1991. Crianza de Alpacas, Capacitación y Asistencia Técnica en la Explotación de Alpacas – Comunidad Campesina de Aquia – Ancash-Perú. Fundación para el Desarrollo Nacional. Fondo Coop. PU – 259/FDN/IAF. Puno, Perú.
134. Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. Vet. Res. 36:133-156.